

SÉRIE A, N° 288

N° D'ORDRE

942

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. PIERRE MAZÉ

Ancien élève de l'Institut agronomique,
Préparateur à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — *Les Microbes des nodosités des légumineuses.*

2^e THÈSE. — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 7¹² février 1898, devant la Commission d'examen.

Président : M. FRIEDEL,

Examineurs : MM. { BOUTY,
DUCLAUX.

SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

68-70, RUE HOUDAN, 68-70

1898

SÉRIE A, N° 288

N° D'ORDRE

942

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. PIERRE MAZÉ

Ancien élève de l'Institut agronomique,
Préparateur à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — *Les Microbes des nodosités des légumineuses.*

2^e THÈSE. — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 7 février 1898, devant la Commission d'examen.

Président : M. FRIEDEL,

Examineurs : MM. { BOUTY,
DUCLAUX.



SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

68-70, RUE HOUDAN, 68-70

1898

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

	MM.	
DOYEN		DARBOUX, professeur. Géométrie supérieure.
PROFESSEUR HONORAIRE	} HERMITE.	
		DE LACAZE-DUTHIERS. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		TROOST. Chimie.
		FRIEDEL. Chimie organique.
		LIPPMANN. Physique.
		HAUTEFEUILLE. . . . Minéralogie.
		BOUTY. Physique.
		APPELL. Mécanique rationnelle.
		DUCLAUX. Chimie biologique.
		BOUSSINESQ. Physique mathématique et Calcul des probabilités.
PROFESSEURS		PICARD. Analyse supérieure et Algèbre supé- rieure.
		POINCARÉ. Astronomie mathématique et Mécani- que céleste.
		YVES DELAGE. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		GASTON BONNIER. . . . Botanique.
		DASTRE. Physiologie.
		DITTE. Chimie.
		MUNIER-CHALMAS. . . . Géologie.
		GIARD. Zoologie, Évolution des êtres organisés.
		WOLF. Astronomie physique.
		KOENIGS. Mécanique physique et expérimentale.
		VÉLAIN. Géographie physique.
		GOURSAT. Calcul différentiel et Calcul intégral.
PROFESSEURS ADJOINTS	{	CHATIN. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
	{	PELLAT. Physique.
	{	PUISEUX. Mécanique et Astronomie.
SECRÉTAIRE		FOUSSEREAU.

A MONSIEUR E. DUCLAUX

Directeur de l'Institut Pasteur,
Professeur à la Faculté des sciences et à l'Institut agronomique,
Membre de l'Institut.

Hommage de respectueux attachement et de profonde
reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MON PÈRE

LES MICROBES DES NODOSITÉS DES LÉGUMINEUSES

PAR M. MAZÉ

Préparateur à l'Institut Pasteur

PREMIÈRE PARTIE

Étude physiologique.

I

FIXATION DE L'AZOTE LIBRE PAR LES MICROBES DES NODOSITÉS

La fixation de l'azote libre par les légumineuses portant des nodosités sur leurs racines n'est plus contestée nulle part : le point sur lequel les savants ne sont pas encore d'accord, c'est sur le mécanisme de cette fixation. L'explication serait bien simple si le bacille des nodosités était capable d'emprunter à l'atmosphère de l'azote gazeux. Mais toutes les tentatives faites pour démontrer l'existence de cette propriété sont restées à peu près stériles. Elles n'ont abouti qu'à montrer la fixation de quantités d'azote très minimes, dépassant de très peu, dans les cas les plus favorables, les limites des erreurs d'expérience. De sorte qu'en désespoir de cause on s'est arrêté à cette explication vague, que la fixation d'azote résulte d'une symbiose de la plante et de la bactérie.

Ce mot symbiose est un mot abstrait qu'on met à la place des notions concrètes que la science ne possède pas. S'il a par lui-même une signification, il ne peut vouloir dire autre chose que ceci : si on fournit à la bactérie, en quantité et en qualité, tout ce que la plante lui donne, cette bactérie devra se comporter en cultures artificielles comme elle le fait sur la plante, et si c'est elle qui fixe l'azote, elle devra aussi fixer ce gaz dans un matras où on la cultive.

C'est au moins à cette conception que m'a conduit la *Revue critique* que M. Duclaux a publiée dans ces *Annales* (1894, p. 728), et dans laquelle il mettait, en regard du travail négatif nécessaire pour l'organisation de l'azote gazeux, les travaux positifs fournis par certaines matières alimentaires que le microbe fixateur d'azote était obligé de consommer. Il n'y avait, pour mettre cette idée en œuvre, qu'à chercher, dans les documents publiés, quels étaient les besoins alimentaires du bacille des nodosités.

En réfléchissant à ce sujet, il m'a paru qu'on avait fait fausse route au sujet de l'alimentation en azote de ce bacille. Sous prétexte qu'il est capable d'assimiler cet azote sur les racines de la plante, on ne le lui a d'ordinaire fourni qu'à l'état gazeux dans la culture artificielle, ou encore à l'état de sels ammoniacaux ou d'asparagine. Pourquoi le contrarier lorsqu'on veut l'interroger sur ses fonctions physiologiques? Dans la plante, il trouve une matière albuminoïde toute faite dès l'origine, et il suffit qu'il puisse contribuer à l'augmenter. Conformément à ce point de vue, on pouvait essayer de le cultiver en présence d'une matière albuminoïde, de légumine de préférence, et de voir si le poids total d'azote combiné dans la culture est plus grand à la fin qu'au commencement.

S'il fixe de l'azote, il doit, conformément aux résultats de M. Winogradsky¹ et aux idées développées par M. Duclaux, détruire de la matière hydrocarbonée. Il est difficile de savoir celle que lui fournit la plante; mais on peut, dans les cultures artificielles, se contenter du saccharose, dont Frank², Laurent³, Beyerinck⁴ ont constaté l'action bienfaisante. Ils l'ont seulement employé un peu timidement, les premiers à la dose de 4 0/0, M. Beyerinck à la dose de 2 0/0 dans ses derniers essais. Il semble qu'on puisse augmenter ces doses, si la destruction d'une certaine quantité de sucre est la rançon de l'organisation d'une certaine quantité d'azote.

Enfin l'oxygène semble non moins nécessaire pendant la durée de la culture. La bactérie des nodosités en trouve con-

1. *Archives des sciences biologiques*, t. III, 1895.

2. *Berichte der Deutsch. Bot. Gesell.* VIII. — *Bot. Centralb.* XLVI.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891.

4. *Bot. Zeitung*, 1888 et 1890. — *Centralb. für Bakter.* 1892.

stamment dans le sol, et la forme ramifiée, aplatie, striée des nodosités semble attester ce besoin d'oxygène. Ceci conduisait à essayer des cultures en surface sur des milieux solides, et j'ai par ce moyen obtenu, en effet, comme on va le voir, en quatre jours, à la température de la chambre au mois de juillet, des cultures d'une richesse incomparable. L'épaisseur du dépôt muqueux dans les tubes verticaux à gélose inclinée atteint 1,5 à 2 c. c. en 8 jours.

Le bouillon dont je me suis servi provenait d'une infusion à 100° de haricots blancs pendant une demi-heure. J'évitais de pousser jusqu'à la cuisson, pour que la fécule ne se répandit pas dans le liquide. Ce bouillon contenait environ 2 dix-millièmes d'azote. On y ajoutait 2 0/0 de saccharose, 1 0/00 de chlorure de sodium et des traces de bicarbonate de soude. Le bouillon précédent, solidifié par l'addition de 15 0/00 de gélose, est réparti en couches très-minces sur le fond plat de grands vases, de 20 à 22 centimètres de diamètre.

L'épaisseur de la gélose varie de 0 à 4 millimètres, car le fond est généralement un peu convexe en dedans. Ces vases, bien connus des bactériologistes, sont munis d'un goulot vertical de 2 à 3 centimètres de diamètre, avec étranglement; une petite tubulure latérale, horizontale, placée à un centimètre environ au-dessus du fond, permet de faire passer sur les cultures un courant d'air continu; j'espérais par ce moyen parvenir à exalter l'activité du microbe, en satisfaisant largement à ses besoins d'oxygène. Plusieurs vases, rendus solidaires les uns des autres par des tubes de caoutchouc, étaient placés sur un même courant d'air produit par un aspirateur. Il est évident qu'il fallait prendre la précaution de purger cet air de toute trace d'azote combiné; dans ce but, on lui faisait traverser :

1° Un tube de verre peu fusible, rempli de tournure de cuivre sur une longueur de 30 centimètres à peu près, et modérément chauffé au dessous du rouge sombre, de façon à ne pas produire un appauvrissement sensible de l'air en oxygène; comme les nitrates se trouvent sous forme de poussières cristallines dans l'atmosphère, on en interceptait la plus grande partie par une longue bourre d'amianté placée en avant du cuivre;

2° Un tube à ponce sulfurique destiné à absorber l'ammoniaque libre, qui est le composé azoté le plus important de l'atmos-

phère, surtout de celle des laboratoires où il s'en forme constamment pendant la combustion du gaz ;

3° Un barboteur à eau qui avait pour but de saturer l'air de vapeur d'eau, afin d'éviter toute évaporation dans les vases de culture.

Le dernier de ces vases était en communication directe avec l'aspirateur. Celui-ci était réglé de façon à débiter 20 litres d'eau par 24 heures, sans compter le renouvellement plus rapide de l'atmosphère des cultures qui se pratiquait tous les matins, afin de les débarrasser des produits gazeux de la respiration accumulés pendant la dernière partie de la nuit, à la faveur d'une circulation trop lente causée par une diminution de pression dans l'aspirateur. Cette précaution se justifiait également par l'absorption sensible d'oxygène provoquée par un contact trop prolongé de l'air avec le cuivre chauffé.

Je dois noter aussi la façon dont je faisais l'ensemencement des vases, car il n'est pas facile de recouvrir une si grande surface de gélose d'une couche uniforme de germes, si l'on ne veut pas y introduire une quantité sensible d'eau ; j'ai obtenu un résultat très satisfaisant à l'aide d'une pipette à étranglement munie d'une effilure aussi fine que possible, et dont l'extrémité était tordue en demi-tour de spire ; c'était en somme un petit pulvérisateur ; la pression nécessaire était fournie par une poire en caoutchouc ; en imprimant à la pipette un mouvement de rotation, on recouvrait la surface de la gélose d'un nuage de gouttelettes liquides ; l'ensemencement pouvait se faire de cette façon par la tubulure horizontale, ce qui permettait d'éviter toute chance de contamination.

Expérience I. — Le 2 juillet, trois vases ont étéensemencés ; le 4, la gélose était recouverte d'une couche régulière de microbes, à surface glacée caractéristique ; au bout de 4 jours le mucus était déjà très abondant ; le développement, à la température de la chambre, oscillant entre 20 et 25°, se faisait très vite.

Après dix jours, la surface de la gélose était recouverte d'une couche de mucosité dont l'épaisseur était remarquable ; le courant d'air semblait exercer sur le développement du bacille une influence très favorable. A partir du 12^e jour, l'aspect ne change plus ; l'expérience est arrêtée le 17 juillet ; elle avait duré 15 jours. La culture examinée au microscope se montre pure ; le

mucus est peu visqueux, mais d'une consistance épaisse; les bâtonnets sont courts, gros, et se colorent difficilement, même par la fuchsine; les cultures ne montrent pas de jeunes bacilles bien colorés; les matières nutritives du milieu devaient être bien épuisées. Pour vérifier la pureté des cultures, j'ai ensemencé quelques tubes de gélose afin d'examiner les organismes jeunes; trois jours après, ces tubes présentaient l'aspect caractéristique des cultures; le microscope montrait des bâtonnets irréguliers, avec une extrémité légèrement renflée.

Les dosages de l'azote avant et après l'expérience ont été faits par le procédé Kjeldahl. La masse liquéfiée était aspirée dans des ampoules de verre à parois très minces, tarées d'avance, d'une contenance de 7 à 8 c.c.; on les remplissait à 1/2 c.c. près, puis on fermait les deux extrémités à la lampe; pesées à nouveau, on les introduisait dans les ballons où devait se faire l'attaque par l'acide sulfurique; l'ampoule présentait toujours du côté du goulot la bulle d'air emprisonnée; on la brisait en appuyant sur cette bulle l'extrémité d'un agitateur en verre, rougi à la flamme.

Puis on évaporait à quelques gouttes au bain de sable, à une température inférieure à 100°; le petit volume de liquide restant était étalé sur les parois du ballon par agitation, et s'évaporait presque en totalité pendant le refroidissement; l'attaque se faisait en présence d'une goutte de mercure; l'acide sulfurique employé avait été vérifié par une opération à blanc.

Voici les résultats fournis par l'analyse, pour la première expérience; ils ne sont pas l'expression d'une moyenne de plusieurs analyses, mais bien la somme des chiffres de plusieurs opérations concordantes,

Azote initial dans les trois vases.....	62mgr 1
Azote final.....	102 9
Gain d'azote.....	40mgr 8

Rapport de l'azote gagné à l'azote initial = 2/3 environ.

Il eût été très intéressant de déterminer par l'analyse la quantité de sucre consommé; mais j'ai craint de saccharifier une partie de la gélose par l'action de l'acide employé pour intervertir le saccharose; en supposant que tout le sucre a été transformé,

soit 3^{er},075, le rapport de l'azote gagné au sucre détruit est

$$\frac{40,8}{3075} = 0,013, \text{ à peu près.}$$

Ce rapport provisoire nous servira plus loin, lorsque de nouvelles expériences nous permettront de le considérer comme à peu près rigoureux, c'est-à-dire lorsque nous nous serons convaincus que, dans la durée de l'expérience, tout le sucre introduit a été consommé.

Expérience II. — Dans le cours de l'expérience précédente, je me suis demandé s'il ne s'était pas produit une déperdition d'azote sous forme d'ammoniaque entraîné par le courant d'air. Les cultures du bacille des légumineuses dans du bouillon de haricot exhalent une forte odeur, qui n'est pas sans analogie avec celle que dégagent les fromages à pâte molle (brie et camembert). Je connaissais depuis longtemps cette odeur; mais, dans ces cultures à grande surface et à circulation d'air, elle était devenue tellement pénétrante que des doutes me vinrent sur sa nature.

Y avait-il de l'ammoniaque dans les gaz recueillis dans l'aspirateur? L'hypothèse n'a rien d'in vraisemblable; un grand nombre de microbes aérobies transforment les matières albuminoïdes en ammoniaque. Le bacille des légumineuses pouvait à la rigueur en faire autant. Cette observation exigeait l'interposition d'un barboteur à acide sulfurique entre le dernier vase de culture et l'aspirateur.

Une deuxième expérience fut donc mise en train avec cette seule modification, le 25 juillet; le 26, le développement est manifeste, il marche activement; comme dans la première expérience, la quantité de mucosité formée est également surprenante; le 9 août, on a mis fin à l'expérience, elle a duré 15 jours.

L'analyse du liquide du barboteur n'a pas donné de traces d'ammoniaque; ce résultat était d'ailleurs à prévoir, car l'odeur du gaz sortant de la culture n'était pas sensiblement modifiée par l'acide sulfurique; cette analyse a constitué en somme une vérification nouvelle des réactifs et des appareils.

La quantité de liquide répartie dans deux vases était de 175^{er} 238; l'analyse a fourni:

Azote initial.....	70 ^{mgr} 7
Azote final.....	418 2
Azote gagné.....	47 ^{mgr} 5
Azote initial = $\frac{70,7}{3\,504,7} = \frac{4}{50}$	
Sucre initial = $\frac{47,5}{3\,504,7} = 0,013$	à peu près.
Azote gagné = $\frac{47,5}{70,7} = \frac{2}{3}$	environ.

Le rapport de l'azote initial au sucre consommé n'est exact que sous la réserve indiquée précédemment. Cet inconvénient, inhérent à la gélose, joint à celui qui résulte de l'emploi d'ampoules de verre pour effectuer les pesées, constituaient un défaut de méthode et une difficulté de manipulation qu'il fallait éviter. Les milieux liquides, seuls, peuvent permettre de les tourner, car il ne faut pas songer à la gélatine.

Les milieux liquides ne m'avaient pas fourni, dans mes essais avec des tubes ordinaires, des résultats comparables à ceux que j'avais obtenus avec de la gélose ; le dépôt formé lentement au fond des tubes, dans un liquide dont l'épaisseur variait de 4 à 5 c. c., semblait inerte ; on aurait dit un dépôt de matière amorphe ; cependant, j'ai vu dans la suite qu'en prenant la précaution de ne jamais agiter les tubes, on obtient des résultats identiques à ceux que je vais exposer dans l'expérience suivante. Pendant que la plus grande partie des microbes tombent au fond des tubes, quelques-uns se maintiennent à la surface et se disposent en cercle autour de la paroi, dans cette partie du liquide qui s'élève par capillarité le long du verre ; ils s'y multiplient et forment peu à peu une membrane continue qui recouvre toute la surface du bouillon. Il faut attendre au moins 15 jours pour obtenir cette membrane, mais la plus petite secousse la submerge ; elle se disloque et tombe peu à peu au fond pour ne plus se reformer ; lorsqu'elle se maintient à la surface, elle s'épaissit rapidement et forme une sorte de bouchon à surface luisante, régulière ; le liquide sous-jacent devient visqueux, épais, peu coulant : il reste cependant hyalin, transparent ; quelques rares flocons presque imperceptibles s'y maintiennent en suspension.

D'où provient cette viscosité du liquide ?

Évidemment d'une élaboration particulière au bacille des légumineuses, et non de l'action d'une diastase quelconque sur le sucre du bouillon, car le liquide qui surnage le dépôt formé au fond des tubes, dans les cultures dépourvues de membrane, conserve sa fluidité. On ne peut attribuer ces résultats qu'à une aération plus ou moins parfaite.

M. Laurent¹, du reste, avait déjà préconisé l'emploi de couches minces de liquides, 3 ou 4 millimètres tout au plus ; il avait vu qu'en prenant cette précaution on favorisait le développement du bacille. Mais pour se mettre à l'abri de l'azote combiné de l'air, il recommande d'effiler les tubulures du récipient de culture ; c'était une précaution nuisible, car dans ces conditions l'aération se faisait mal. Cet inconvénient n'existe plus dans les expériences qui suivent, car j'ai adopté la même disposition que ci-dessus ; seul le barboteur à acide sulfurique, dont la présence était inutile, avait été supprimé.

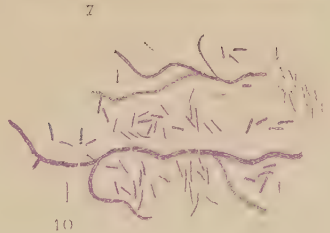
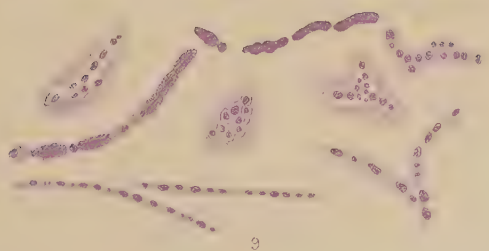
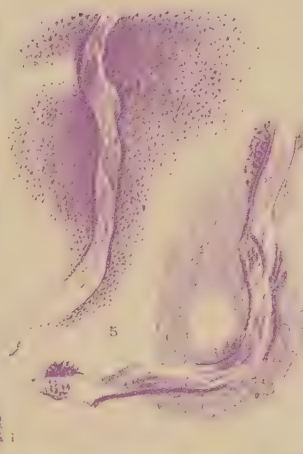
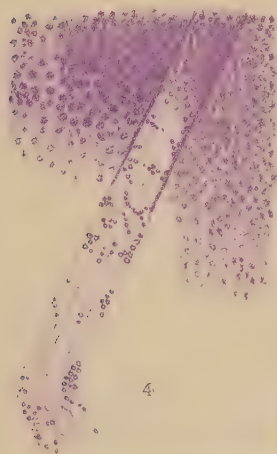
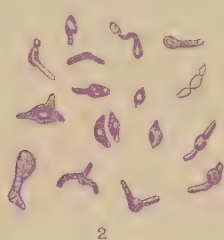
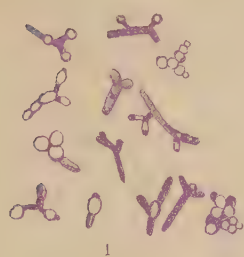
Expérience III. — Le 7 août, deux vases reçoivent chacun 50 c. c. de bouillon de haricot additionné des substances suivantes :

Sucre	2,6 %
Chlorure de sodium	0,1
Bicarbonate de soude	traces.

Dès le premier jour le liquide se trouble ; puis le deuxième et troisième jour il se forme un dépôt qui constitue bientôt une membrane adhérent légèrement au fond ; le cinquième jour, la mucosité est tellement épaisse dans les parties les moins profondes du liquide, qu'elle forme un bourrelet visiblement plus élevé que le niveau du liquide. Ce bourrelet n'obéit pas aux mouvements imprimés au vase ; il gagne les parties les plus profondes, qui se gélatinisent peu à peu pour se figer à leur tour vers le treizième jour ; le quinzième jour, toute la masse est presque solide ; elle coule péniblement lorsqu'on incline les vases ; son aspect, d'un blanc grisâtre, rappelle celui de la vase-line ; la surface est régulière, glacée.

Le 23 août 1896, on met fin à l'expérience ; la culture se diffuse facilement dans l'eau : aucune trace de membrane ne subsiste après une légère agitation.

1. Ces *Annales*, 1892.



Les résultats de l'analyse pour les deux vases réunis sont les suivants :

Azote initial	22mg,4
Azote final.....	48 5
Azote gagné	<u>23mg,4</u>
Rapport de l'azote gagné à l'azote initial :	$\frac{23,4}{22,4} = 1,04.$
Rapport de l'azote initial au sucre initial :	$\frac{22,4}{2600} < 0,01.$
Rapport de l'azote gagné au sucre initial :	$\frac{23,4}{2600} < 0,01.$

Dans l'espace de 16 jours, tout le sucre avait été consommé; nul doute que dans les cultures sur milieu solide, mieux aéré, le même résultat était atteint lorsqu'on a mis fin à l'expérience; nous pouvons donc maintenant considérer les rapports établis plus haut comme tout à fait rigoureux.

Conclusions. — Les résultats précédents réalisent d'un bout à l'autre les espérances que j'avais formulées *a priori*. Les bacilles des légumineuses, placés dans un milieu convenable qui rappelle d'aussi près que possible les conditions naturelles qu'ils trouvent dans les nodosités, se développent d'une façon surprenante et remplissent leur fonction si importante de la fixation de l'azote libre de l'atmosphère. Le symbiose n'est plus nécessaire pour expliquer la fixation de l'azote par le microbe des nodosités; cette propriété lui appartient en propre, indépendamment de l'influence exercée par la plante. Il ne naît point du concours de ces deux êtres une force nouvelle dont l'action est nécessaire pour faire entrer l'azote libre dans les composés organiques ou organisés, et l'hypothèse adoptée jusqu'ici pour expliquer le mécanisme de la symbiose, exposée avec tant de netteté par M. Duclaux (*loc. cit.*), reste entière et reçoit la consécration de l'expérience. La plante héberge un être, lui fournit les hydrates de carbone et l'azote organique dont il se nourrit et dans lesquels il puise en même temps l'énergie nécessaire pour fixer l'azote libre qu'il doit mettre, comme le dit M. Nobbe, sous une forme assimilable pour le végétal.

Les insuccès rencontrés jusqu'ici dans cette voie sont dus principalement à un défaut de méthode ou à une évaluation insuffisante de l'énergie nécessaire pour permettre au bacille des nodosités

de faire entrer l'azote atmosphérique dans une combinaison endothermique. Placer cet organisme dans un milieu privé d'azote combiné revient à l'obliger à se nourrir aux dépens de l'azote atmosphérique; c'est lui demander un surcroît de travail qu'il n'est pas capable de fournir.

Il faut qu'avant tout il assure son existence et qu'il se multiplie aux dépens d'une réserve toute préparée, tout comme la plante vit aux dépens des ressources accumulées dans les cotylédons, en attendant qu'elle ait formé les organes qui lui permettront de prendre ses aliments dans le sol et dans l'air. Les jeunes cellules, une fois formées, se paieront le luxe d'un travail facultatif, à condition qu'elles trouvent dans les milieux de culture un excès d'hydrate de carbone qui fournira de l'énergie pour faire la synthèse des composés quaternaires.

On voit que la dose de sucre ne peut guère tomber au-dessous de 2 0/0, car les expérimentateurs qui ont opéré avec des milieux renfermant 1 0/0 de sucre seulement n'ont pas constaté d'enrichissement en azote. L'accès facile de l'air exerce également une influence très favorable sur la fixation de l'azote, et cela se comprend, car la rapidité de la combustion du sucre est en relation avec la quantité d'oxygène fourni aux cultures. C'est parce qu'il n'a pas rempli cette condition d'aération que M. Beyerrinck n'a observé qu'une fixation trop faible pour être probante.

Nous reviendrons plus tard sur le rôle de l'air. Pour le moment il nous reste à présenter quelques observations sur les rapports entre l'azote gagné et le sucre initial fourni aux cultures. Dans l'expérience III, ce rapport est un peu inférieur à 1 0/0; si les mêmes conditions étaient réalisées dans la plante, celle-ci devrait fournir au bacille un poids d'hydrates de carbone 100 fois plus grand que le poids de l'azote total qui fait partie de ses tissus à la fin de son développement; autrement dit la plante devra fournir au bacille 100 grammes d'amidon pour recevoir en échange 1 gramme d'azote.

Une plante peut-elle suffire à ce travail? Cette question reste sans réponse en ce qui concerne les légumineuses, car nous n'avons d'autre moyen d'évaluer l'énergie disparue par la combustion des hydrates de carbone qu'en tablant sur l'un des rapports que nous avons établis. Mais nous pouvons procéder par

comparaison avec la betterave à sucre, pour laquelle les éléments de notre rapport sont connus.

Une bonne betterave à sucre renferme en moyenne 1,40 0/0 de matières azotées solubles et insolubles, et 14 0/0 de saccharose. On sait qu'on peut passer de l'azote total à la protéine brute en multipliant le chiffre fourni par l'analyse par le facteur 6,25. Faisons ici l'opération inverse, elle est loin d'être rigoureuse, mais nous opérons sur des moyennes ; nous obtenons ainsi pour l'azote total de la betterave 0,224 0/0. Le rapport de l'azote total au sucre est donc

$$\frac{0,224}{14} = 0,016$$

Ce chiffre est un peu supérieur à celui qui nous a été fourni par l'expérience III, mais il y a des betteraves dans lesquelles le sucre atteint 18 à 20 0/0 du poids de la racine. On voit donc que la betterave pourrait facilement emprunter son azote à l'atmosphère pendant sa seconde année, si, comme dans les légumineuses, une cause étrangère venait transformer dans ce sens toute l'énergie qu'elle peut accumuler. Les légumineuses ne possèdent pas d'autres réserves d'hydrates de carbone que celle qui se trouve dans les graines ; mais elles sont particulièrement riches en azote, et maintenant nous pouvons affirmer qu'elles peuvent, aussi bien que la betterave sucrière, emprunter aux radiations solaires l'énergie nécessaire pour fabriquer, par l'intermédiaire des bacilles, toute la matière azotée qui entre dans leurs tissus : le rapport de la surface foliaire au poids total de la plante, dans le trèfle ou la luzerne par exemple, est certainement tout aussi élevé que celui que fournit la betterave ; la durée de végétation des légumineuses est en outre plus longue que celle de la betterave : la température minima à laquelle cette végétation se manifeste est encore un argument en faveur des légumineuses.

II

LES MICROBES DES NODOSITÉS ET L'AIR ATMOSPHÉRIQUE.

Nous venons de voir que le bacille des légumineuses est un microbe essentiellement aérobie. Pour nous faire une idée nette de ses besoins d'oxygène, prenons deux ballons plats à deux tubu-

lures munis d'une couche de quelques millimètres de gélose de même composition que celle qui nous a déjà servi. Ensemençons-les et plaçons-les en dérivation sur le courant d'air dépouillé d'azote combiné qui circule sur d'autres cultures, après les avoir fait précéder d'un tube en U rempli de ponce imbibée de potasse, pour absorber l'acide carbonique de cet air. Isolons maintenant l'atmosphère des deux vases à l'aide de deux pinces à vis placées sur les caoutchoucs des deux extrémités. La masse d'air ainsi confinée est munie d'un manomètre à mercure formé d'un tube en U presque capillaire, gradué.

L'appareil reste fermé pendant huit jours, à une température moyenne de 23-24°. Au bout de ce temps on fait une prise d'air à l'aide d'une trompe de Schlœsing; on la mesure dans une éprouvette de Schlœsing, et on étudie sa composition.

Ces manipulations terminées, on a renouvelé l'atmosphère des cultures à l'aide de la trompe que l'on faisait fonctionner assez longtemps pour entraîner l'acide carbonique dissous. Puis on l'a isolée de nouveau et, 64 heures après, on a recommencé la même opération afin de se rendre compte de l'absorption d'oxygène dans une culture en plein développement.

Une troisième analyse a été faite 24 heures après la seconde.

Voici les résultats en volume rapportés à 100 du gaz, à la pression 760 et à 0°.

NATURE DES GAZ	1 ^{re} ANALYSE	2 ^e ANALYSE	3 ^e ANALYSE
Acide carbonique.....	20,7	18,7	8,04
Oxygène.....	1,8	3,16	13,41
Azote + argon.....	77,5	78,14	78,55
Acide carbonique + oxygène..	22,5	21,86	21,45

Les chiffres de ce tableau montrent combien le bacille des légumineuses est avide d'oxygène. En 24 heures, une culture d'une surface totale d'environ 27 décim. carrés absorbe le tiers du volume d'oxygène contenu dans une atmosphère confinée de 5 l., soit 330 c. c.

Considérons maintenant les chiffres de la quatrième ligne horizontale; ils sont tous supérieurs au nombre 21 qui représente la teneur normale de l'air en oxygène; cela veut dire que le rapport de l'acide carbonique à l'oxygène est toujours supé-

rieur à 1¹. A côté d'une combustion complète qui se traduirait par la mise en liberté d'un volume d'acide carbonique égal au volume d'oxygène absorbé, il y a une dislocation plus ou moins avancée de la molécule de saccharose. Les produits intermédiaires de cette dislocation ne sont pas constitués par des acides volatils ou fixes, puisque le milieu conserve sa réaction alcaline ; ils ne peuvent être que des corps plus ou moins oxydés, quelques-uns volatils, dont la présence se révèle par l'odeur caractéristique des cultures. Les milieux liquides qui se chargent peu à peu de tous ces produits de la combustion du sucre, deviennent de plus en plus impropres à la culture du microbe, si on ne prend pas la précaution de les en débarrasser. Voilà une autre raison qui explique la supériorité des cultures peu profondes et de grande surface, au point de vue de la fixation de l'azote atmosphérique.

Ce n'est pas tout, nos chiffres comportent encore un enseignement : on conçoit que les hydrates de carbone soient épuisés rapidement par un dégagement aussi abondant d'acide carbonique. Évaluons, en effet, la quantité de carbone mise en liberté au moment de notre dernière prise d'air, c'est-à-dire après 12 jours d'expérience. Cela est très facile, connaissant le volume de l'atmosphère confinée et la quantité de saccharose introduite dans la culture.

On trouve ainsi que sur 1,347^{mgr},3 de carbone introduits dans la culture sous forme de saccharose, 1,035^{mgr},6 sont mis en liberté à l'état d'acide carbonique.

Ces chiffres nous prouvent qu'une culture du bacille des nodosités, âgée de 16 à 20 jours, dans laquelle la liqueur de Fehling ne révèle plus trace de sucre réducteur après inversion préalable, a perdu la presque totalité du carbone que le saccharose y avait

1. Ce rapport n'est pas, en réalité, aussi éloigné de l'unité que l'indiquent les calculs ; on ne tient pas compte en effet de l'azote fixé ; on sait cependant que toute diminution d'azote libre se traduit par une augmentation apparente de $\text{CO}_2 + \text{O}$; mais la différence entre les nombres 79 et 77,5 fournis par la première analyse, ne provient pas tout entière de l'appauvrissement de l'atmosphère en azote, car s'il en était ainsi, au bout de huit jours, dans une atmosphère confinée de 5 l., nous obtiendrions un gain d'azote de 70 milligr. Or, en 16 jours, dans un courant d'air continu, nous n'avons pas obtenu ce résultat, à beaucoup près. L'excès d'acide carbonique dégagé sur l'oxygène absorbé se traduit d'ailleurs par une augmentation constante de pression, indépendante des oscillations barométriques.

apporté. Mais, en échange, il s'y est produit un gain d'azote, et il s'y est formé une mucosité si abondante que les milieux liquides servant à la culture, en couche mince, sont presque solidifiés.

Dans la fermentation visqueuse des jus sucrés, quelque chose de semblable se produit; mais l'analogie est toute superficielle. La matière visqueuse provient d'une sorte de transformation isomérique du sucre; avec le bacille des nodosités on assiste à une combustion presque parfaite du saccharose; la mucosité qu'il fabrique nous apparaît donc comme une substance digne d'attention; lorsqu'elle se forme abondamment, il y a fixation d'azote; lorsqu'elle est absente ou peu abondante, on ne constate pas de gain d'azote dans les cultures. C'est ce rapprochement que je voulais mettre en relief: les faits nous l'imposeront encore plus d'une fois dans le cours de ce travail.

D'après tout ce qui précède, nous voyons que le bacille des légumineuses est un microbe essentiellement aérobie; l'azote atmosphérique ne joue dans sa vie qu'un rôle très effacé; une fraction très petite seulement est mise en jeu.

M. Laurent a cependant constaté la formation de colonies dans une atmosphère d'azote pur; cette observation semble en contradiction avec les faits que nous venons d'exposer, et elle mérite d'être étudiée.

Prenons pour cela des tubes à essai ordinaires, et soudons une tubulure à étranglement à l'extrémité fermée; étirons l'autre extrémité de façon à obtenir une tubulure semblable à la première; celle-ci est légèrement inclinée sur l'axe du tube pour permettre de le pencher lorsqu'il contient quelques centimètres cubes de gélose. Grâce à ce dispositif, on peut placer ces tubes les uns à la suite des autres sur un courant d'azote préparé en faisant agir le nitrite de potassium sur le chlorure d'ammonium, en solution concentrée; le gaz est débarrassé des produits nitreux et de l'ammoniacque par des flacons laveurs remplis de potasse et d'acide sulfurique. Les tubes sont adaptés encore bouillants sur l'appareil purgé d'air par le dégagement de l'azote.

Puis on attend une demi-heure; au bout de ce temps, la gélose est solide et froide; on l'ensemence avec deux ou trois gouttes d'une dilution copieuse de bacilles, et quelques minutes après, on ferme les deux extrémités à la lampe sur le courant

d'azote. On ensemence ensuite les autres tubes les uns après les autres, et on les scelle à la flamme de la même manière.

Ces cultures ont été conservées à la température de la chambre avec des témoins préparés de la même façon, mais remplis d'air. Au bout de 5 jours ceux-ci donnent une culture abondante; les autres ne présentent pas de développement visible à l'œil nu; on en sacrifie un et on prend avec une pipette une goutte de la dilution qui surnage pour l'ensemencer dans un tube ouvert; celui-ci se couvre de colonies au bout de 3 jours.

Au bout de 15 jours on ouvre deux autres tubes sur lesquels on ne constate pas non plus trace de développement; on s'en sert pour ensemencer des tubes ordinaires; les germes conservés à l'abri de l'air pendant 15 jours poussent encore énergiquement.

On a refait la même expérience avec une nouvelle série de 4 tubes préparés de la même façon; ils ont fourni les mêmes résultats.

Le bacille des légumineuses ne pousse donc pas dans une atmosphère d'azote pur; M. Laurent n'a sans doute observé la formation de colonies que parce que son azote, obtenu par l'oxydation du cuivre porté au rouge, renfermait encore des traces d'oxygène.

III

INFLUENCE DE LA RICHESSE DES MILIEUX EN AZOTE COMBINÉ ET EN SACCHAROSE SUR LA FIXATION DE L'AZOTE LIBRE.

Jusqu'ici, nous nous sommes bornés à étudier la fixation de l'azote libre dans des cultures de composition à peu près constante. Deux éléments exercent une action prépondérante sur le résultat final: l'azote combiné et le saccharose; faisons varier l'un et l'autre, et cherchons quelle est l'influence de ces variations sur le gain d'azote.

Dans ce but, mettons en culture 3 ballons plats renfermant 50 c. c. de bouillon de haricots préparé comme plus haut; comme

l'eau du robinet est suffisamment alcaline par elle-même, on supprime le bicarbonate de soude; on supprime également le chlorure de sodium qui, à la dose de 5 0/00, paralyse le développement du microbe. Ces ballons contenaient avant l'expérience :

	AZOTE	SACCHAROSE
N ^o 1.....	41 mg,6	4 gr,75
— 2.....	9 8	2
— 3.....	9 8	2 25
— 4.....	9	2 50
— 5.....	9	3

Observations sur les cultures. — Le n^o 1 se trouble fortement dans les 24 heures. Les n^{os} 2 et 3 se développent plus lentement; les microbes forment une membrane adhérente au fond du vase, visible dès le 2^e jour; la mucosité se développe presque aussi rapidement que dans le n^o 1, dont le bouillon est complètement figé au bout de 8-9 jours.

Il n'en est pas de même pour les n^{os} 4 et 5; la membrane de fond ne devient visible qu'au 4^e jour, elle apparaît comme une toile d'araignée dont les mailles irrégulières sont réunies par une membrane extrêmement fine. Examinée au microscope avec un grossissement de 50, on la voit striée; dans toutes les directions, de tubes uniformément colorés, lorsqu'on se sert de colorants basiques; si on fait agir modérément l'alcool, ces tubes s'éclaircissent, et l'on distingue nettement dans leur intérieur de petits bacilles noyés dans une enveloppe de mucosité. Ces tubes présentent des renflements et des étranglements sur tout leur parcours. Nous aurons encore l'occasion de les observer dans d'autres circonstances.

Cette membrane s'épaissit lentement, et au bout du vingt et unième jour de culture, au moment où l'on met fin à l'expérience, le liquide surnageant est tout à fait dépourvu de viscosité; le microbe présente l'aspect d'un bacille qui prend bien la couleur.

La culture n^o 1 a été arrêtée au dix-neuvième jour; elle présente tous les caractères des cultures dans lesquelles on constate une fixation abondante d'azote.

Les cultures n^{os} 2 et 3 présentent des formes ramifiées et des formes en poires; à part ce caractère, elles ressemblent à la première, comme aspect, elles ont duré respectivement 21 et 22 jours.

Voici les résultats concernant l'azote et le sucre restant, fournis par l'analyse; les n^{os} 5 et 6 ne figurent pas dans ce tableau; on y retrouve tout le sucre primitif à un décigramme près, et le gain d'azote y a été nul.

	Azote final.	Azote gagné.	Sucre restant.	Sucre consommé.	Rapport de l'azote gagné au sucre consommé.
n° 1	23mgr,7	12mgr,1	0gr,541	4209mgr	$\frac{121}{12090} = \frac{1}{100}$
n° 2	22 ,6	12 ,8	0 ,803	4196	$\frac{128}{41950} > \frac{1}{109}$
n° 3	24 ,8	15	0 ,870	4379,4	$\frac{150}{43794} > \frac{1}{100}$

Eu égard à la durée des cultures, ces résultats sont à peu près identiques; ils concordent avec ceux qui nous ont été fournis par les premières expériences, le rapport de l'azote gagné au sucre consommé oscille toujours aux environs de 1/100.

Ces chiffres nous montrent en outre que le gain d'azote est indépendant de l'aspect morphologique du microbe; la culture n° 1 ne renferme pas de formes ramifiées, les deux autres contiennent un mélange de bacilles simples et de formes ramifiées, ou en poires. Le développement de celles-ci a été cependant plus lent au début; le retard augmente avec la dose de saccharose; à partir de 4,5 0/0, le bacille se multiplie encore, mais la culture reste pauvre; la mucosité ne se forme pas, et il n'y a pas d'azote fixé. Avec 5 et 6 0/0 de sucre, on observe seulement une légère prolifération de microbe.

Calculons maintenant la relation qui existe entre le sucre initial et l'azote fourni au microbe avant l'expérience.

Nous avons les trois rapports suivants :

$$\begin{array}{lcl} \text{n° 1} & \frac{116}{17500} & = \frac{66}{10000} \\ \text{n° 2} & \frac{98}{20000} & = \frac{49}{10000} \\ \text{n° 3} & \frac{98}{22500} & = \frac{43}{10000} \end{array}$$

Si nous prenons la moyenne, nous obtenons le rapport 1/200 en chiffres ronds, ce qui veut dire que les cultures qui fournissent le meilleur rendement au point de vue de la fixation de l'azote doivent renfermer, au début, une partie d'azote combiné pour 200 de saccharose; la limite inférieure du sucre étant 2 0/0 et la limite supérieure 4 0/0.

Reprenons maintenant la même expérience en laissant constante la dose de saccharose et en introduisant des doses variables d'azote combiné.

Cet élément est représenté dans les cultures par les chiffres

16^{mgr},6, 13^{mgr},3, 9^{mgr},9, 6^{mgr},6, 3^{mgr},3.

ils sont entre eux comme les nombre 5, 4, 3, 2, 1; chaque culture avait reçu 1^{gr},5 de saccharose; les quatre premières se sont montrées à peu près aussi actives les unes que les autres au point de vue de la fixation de l'azote libre; le n° 4 s'est développé plus lentement que les trois autres; le n° 5 a donné une membrane de fond, mince et résistante, mais pas de mucosité ni d'azote fixé: sa teneur en azote initial est insuffisante. Nous sommes donc conduit à assigner comme limite minimum à l'azote combiné dans les bouillons de culture le chiffre de 7 milligrammes pour 50 c. c. de liquide; la limite maximum étant naturellement fixée à 15^{mgr} environ par les rapports que nous avons établis plus haut.

Voilà les chiffres; quelles conclusions pouvons-nous en tirer? Ceux qui représentent la limite maximum de saccharose et le minimum d'azote combiné offrent beaucoup d'intérêt. Dans les deux cas, lorsque ces chiffres sont dépassés ou ne sont pas atteints, il n'y a plus de gain d'azote dans les cultures; le développement se fait mal et la mucosité est toujours absente. Cette substance ne se rencontre jamais non plus dans les cultures où le bouillon atteint plusieurs centimètres d'épaisseur et, dans ces conditions, l'analyse ne révèle aucun enrichissement en azote.

Comme nous avons montré, d'autre part, que la mucosité ne résulte pas d'une modification allotropique du sucre, nous sommes conduit à la regarder comme un composé azoté élaboré par le bacille des légumineuses. Dans la série des transformations auxquelles le saccharose est soumis, il se forme des composés capables de s'unir à l'azote atmosphérique, grâce à l'énergie mise en jeu par la dislocation de la molécule de sucre.

Le même phénomène doit se passer dans les tubercules radicaux; cependant, on ne trouve pas de mucosité dans ces formations. Une goutte d'une émulsion faite avec le contenu d'une nodosité possède la fluidité d'une goutte d'eau, et s'étale avec facilité sur une lame de verre. Au contraire, la moindre parcelle d'une culture sur gélose, prise avec un fil de platine, donne une consistance visqueuse à la goutte d'eau dans laquelle on la délaye, et s'étend difficilement sur le verre.

Faut-il en conclure que le bacille des légumineuses ne produit pas de mucosité lorsqu'il se développe dans le tissu des

racines? Cette supposition ne semble pas probable, lorsqu'on voit un fragment de pulpe de nodosité donner sur gélose sucrée une quantité appréciable de cette substance au bout de 24 heures à la température de 24-25°. Si on ne constate pas sa présence dans les tubercules, c'est sans doute parce qu'elle est entraînée par la sève à mesure qu'elle se produit, et c'est probablement elle qui sert de trait d'union entre le microbe et la plante.

Dès que les nodosités apparaissent sur les racines des légumineuses cultivées dans du sable stérile, celles-ci traduisent l'action bienfaisante de leurs hôtes par une reprise très nette de la végétation, succédant à une période de souffrance due à la privation temporaire d'aliment azoté.

MM. Hellriegel et Wilfarth¹, qui ont observé les premiers ces phénomènes, en ont donné une description très nette :

« Ainsi les cultures de légumineuses, en présence de solutions nutritives pourvues de nitrates depuis leur sortie de terre jusqu'à leur récolte, c'est-à-dire jusqu'à l'épuisement des nitrates fournis, ont continué à croître sans aucune interruption visible, tandis que la végétation des cultures privées d'azote tomba pour ainsi dire, par bonds successifs, à trois époques différentes, non moins claires que frappantes.

« Dans la première période qui comprend les trois ou quatre premières semaines de leur existence, pendant lesquelles les jeunes plantes sont alimentées évidemment par la réserve nutritive de la semence, la croissance fut active et normale. A cette période en succéda une autre d'interruption complète et d'arrêt dans la production. Les jeunes plantes perdirent leur fraîche couleur verte; on voyait les vieilles feuilles périr par résorption, tandis que celles qui étaient nouvellement formées poussaient visiblement plus petites que les premières et fort misérables.

« Enfin, à ce moment, les pois se comportèrent exactement comme les graminées végétant dans un sol privé d'azote et depuis longtemps affamées. La durée de cette période fut très variable pour chaque plante : chez les unes elle ne fut que de quelques jours, et chez les autres elle persista pendant plusieurs semaines. Puis la troisième période suivit presque sans transition; les plantes reverdirent, et, recommençant à assimiler, eurent une bonne végétation jusqu'à la fin. »

1. *Untersuchungen über die Stickstoffnahrung*, Berlin, 1888.

Ces observations établissent clairement que la reprise de la végétation coïncide avec l'apparition des nodosités sur les racines; mais MM. Hellriegel et Wilfarth ne disposaient d'aucune preuve matérielle qui leur permit de donner une démonstration rigoureuse de ce fait. L'étude des cultures pures du bacille des nodosités ne fit que l'embrouiller davantage; ce microbe se montrait incapable de fixer de l'azote libre dans les milieux artificiels; tout au plus se développait-il un peu dans les milieux dépourvus d'azote combiné, mais toujours sans gain d'azote appréciable. C'est sur la plante seule qu'il y avait développement, avec fixation d'azote qui, disait-on, entrait dans les tissus des bacilles pour les constituer; c'est cet azote des bacilles qu'utilisait la plante, et les nodosités devenaient ainsi de véritables organes de réserve. Telle était l'opinion de MM. Beyerinck, Prazmowski¹, Frank et Laurent.

Les résultats que nous avons obtenus au point de vue de la fixation de l'azote donnent, de l'observation très exacte de MM. Hellriegel et Wilfarth, une explication aussi simple que satisfaisante. Le bacille fabrique, dans certaines conditions de nutrition hydrocarbonée et azotée, une sève muqueuse et azotée que le végétal utilise.

Les caractères physiques de cette mucosité concordent bien avec le rôle que nous lui attribuons: c'est une substance colloïde, diffusible dans l'eau et susceptible, par conséquent, de servir d'aliment à un organisme vivant; mais quels sont les caractères de cette solution muqueuse? C'est ce dont on peut se faire une idée en cherchant comment elle traverse les membranes ou les cloisons poreuses.

Une culture de 50 c. c., renfermant 26 milligrammes d'azote, étendue de deux fois son volume d'eau distillée, a été filtrée à travers une bougie Chamberland, sous une pression de 20 c. de mercure; la bougie plongeait de 2 c. dans l'eau distillée; la filtration se faisait de l'intérieur vers l'extérieur. Elle a duré 24 heures. La quantité d'azote passée à travers la bougie est de 2^{mgr}6, soit 1/10 de l'azote total.

Une deuxième expérience a été faite avec une culture de 50 c. c. étendue également de deux fois son volume d'eau, mais

1. *Landwirthsch. Versuchstat.*, XXXVIII. — *Bot. Centralbl.*, XXXIX.

ce liquide a été placé cette fois dans un dialyseur cylindrique en papier parcheminé.

L'appareil a été soumis à l'action d'un courant d'eau ordinaire pendant 48 heures, et pendant 36 heures à l'action de l'eau distillée renouvelée toutes les 8 heures. Au bout de ce temps, 0^{mgr}6 d'azote sur 13^{mgr}6 ont passé à travers la membrane. Le contenu du dialyseur a conservé toute sa viscosité et son homogénéité.

On a repris cette expérience avec une culture de 100 c. c. étendue cette fois de 8 fois son volume d'eau distillée.

Dans le même laps de temps et dans les mêmes conditions que tout à l'heure, le liquide a perdu 8^{mgr},5 d'azote; avant l'expérience il en renfermait 32^{mgr},04; un quart environ de l'azote total avait donc traversé la membrane. Le liquide avait perdu toute sa viscosité ou à peu près; les microbes formaient un dépôt aggloméré au fond du dialyseur.

Cette dernière expérience prouve que la culture renferme, à côté de l'azote immobilisé dans le corps des microbes, un composé quaternaire capable de diffuser à travers les membranes. Cette matière azotée diffuse d'autant mieux qu'elle est plus étendue; dans les nodosités elle est donc entraînée facilement par la sève, et c'est pour cette raison qu'on ne la rencontre jamais dans ces organes ¹.

Il peut sembler surprenant que dans ces conditions le microbe qui la produit ne l'utilise pas, et que nous ayons pu voir notre culture n° 5 (p. 18), qui renfermait au début de l'expérience 3^{mgr},3 d'azote combiné, ne donner qu'un faible développement sans aucun gain d'azote après 21 jours de durée. On pourrait croire *a priori* qu'il suffise de fournir une trace d'aliment azoté, pour amorcer la culture et permettre au bacille de s'alimenter en fabriquant son protoplasme aux dépens de l'azote libre, et en consommant les hydrates de carbone qu'on lui a offerts.

1. Le hasard m'a permis cependant de la rencontrer une fois dans des tubercules de pois tardifs, qui étaient encore en pleine végétation au mois de novembre dernier. A la suite d'un abaissement assez brusque de la température, l'assimilation par la plante s'est ralentie, et la production de mucosité a été supérieure à la consommation; elle s'est accumulée dans les tubercules, dont la pulpe très pâteuse, déposée dans une goutte d'eau sur une lame de verre, rend le liquide très visqueux.

Cette observation confirme, d'une manière éclatante, les déductions que j'avais déjà formulées.

L'expérience montre pourtant qu'il n'en est rien. Dans une culture pauvre en azote combiné, le développement est pénible; les microbes se multiplient, mais ils perdent leur activité vis-à-vis de l'azote libre; ils ne consomment pas d'hydrate de carbone ou ils en consomment très peu. Ils n'élaborent pas de mucosité visible, et n'utilisent pas les quantités insaisissables qu'ils pourraient fabriquer, car ils ne poussent pas.

Les corps quaternaires qui constituent la mucosité doivent donc nous apparaître comme des produits d'élaboration microbienne, analogues à l'alcool ou à l'acide lactique, qui sont inattaquables par les cellules qui les ont produits, mais nutritifs pour d'autres organismes.

De ce que les bacilles vivent péniblement dans les milieux contenant de faibles quantités d'azote combiné, comme dans notre expérience n° 5 (p. 18), nous pouvons inférer qu'ils ne se développeront pas dans des milieux privés d'azote. Cette conclusion est en contradiction avec les observations de MM. Franck, Prazmowski et Laurent, mais elle est d'accord par contre avec les résultats de M. Beyerinck, qui a vu le développement des cultures s'arrêter sur gélose renfermant du sucre et des sels, dès que la petite quantité d'azote assimilable est épuisée.

Il y a donc lieu de vérifier ces résultats contradictoires. J'ai pris pour cela deux ballons plats lavés à plusieurs reprises avec de l'acide sulfurique concentré, puis avec de l'eau ordinaire et avec de l'eau distillée, quatre ou cinq fois, pour en enlever toute trace de matière azotée.

Chacun de ces ballons a reçu 50 c. c. de la solution suivante, faite avec de l'eau distillée et des corps chimiquement purs.

Eau distillée.....	1,000	
Saccharose.....	20	
Phosphate de potassium.....	1	
Chlorure de sodium.....	1	
Sulfate de fer.....	} traces	
Sulfate de magnésie.....		
Chlorure de zinc.....		
Saccharate de calcium.....		

Les deux ballons, bouchés avec des tampons d'amiante, ont été stérilisés à 120° etensemencés avec une dilution assez riche

d'une culture âgée sur gélose, faite avec de l'eau distillée stérile. Les cultures étaient parcourues par un courant d'air débarrassé de tout composé azoté par la méthode employée plus haut.

Au bout de huit jours les solutions sont limpides comme au début de l'expérience.

Le contenu d'un vase, examiné au microscope après coloration par le bleu de méthylène, ne montre que quelques bacilles irréguliers, plus ou moins recourbés et prenant mal la couleur; examinés en goutte suspendue, ces bacilles se montrent immobiles.

Ensemencée sur gélose, une goutte du liquide de culture donnait un développement luxuriant au bout de 3 ou 4 jours.

Le second ballon a été laissé en expérience; mais on a arrêté la circulation d'air et on a supprimé toute communication avec l'atmosphère ambiante. Après 28 jours la solution est toujours limpide; l'examen microscopique et la culture d'épreuve ont donné les mêmes résultats que la première culture.

La conclusion est nette : la semence avait conservé toute sa vitalité pendant 28 jours; mais on n'a pas observé, même au microscope, la moindre prolifération de cellules.

Il nous reste, pour terminer l'examen des expériences faites plus haut, à étudier la nature du pseudo-mycélium que l'on observe dans les nodosités, tout à fait au début de leur développement. Dans une coupe fraîche de jeunes tubercules, cette formation présente l'aspect de tubes réfringents non cloisonnés, irréguliers; ils décrivent dans les jeunes cellules un trajet sinueux et semblent traverser les cloisons sans solution de continuité¹.

M. Beyerinck les considère comme les restes des filaments nucléaires désagrégés par l'infection microbienne.

M. Prazmowski en a vu sortir des coccobacilles très fins; il les regarde comme une forme transitoire du bacille des légumineuses qui en dérive par voie endogène. Aux yeux de M. Laurent ils ont la même signification; mais pour lui les microbes ne prennent pas naissance par voie endogène; ils se forment par bourgeonnement comme les formes-levures qui se montrent sur

1. Voir à ce sujet les deux belles planches du Mémoire de M. Laurent (*ces Annales*, t. V).

le mycélium de certaines espèces de champignons microscopiques. M. Prillieux ¹ affirme que ce sont des traînées d'une mucosité analogue à celle qui se forme dans les cultures.

En rapprochant les observations de MM. Prazmowski et Prillieux des faits que nous avons établis, on peut expliquer la production de ces tubes d'une façon simple. Lorsque le microbe envahit les tissus des jeunes racines, il progresse surtout par voie de multiplication; il élabore aussitôt cette substance glaireuse dans laquelle il reste englobé, et c'est ainsi que s'édifient les tubes irréguliers qui affectent l'aspect d'un mycélium et conservent leur apparence organisée tant que les vaisseaux ne se sont pas formés dans les jeunes tubercules; mais lorsque la circulation de la sève se fait régulièrement dans ces organes, la mucosité est entraînée, et les coccobacilles, débarrassés de leur enveloppe, s'allongent et se ramifient.

Si l'on fait une préparation avec la pulpe d'un jeune tubercule à peine visible à l'œil nu, on ne trouve en effet que des coccobacilles; cette pulpe ne renferme jamais de fragments mycéliens, parce que la substance qui les constitue se diffuse immédiatement dans le suc cellulaire et dans la goutte d'eau que l'on dépose sur la lame de verre.

Si ces tubes étaient formés par un être vivant, ils résisteraient comme tous les microorganismes à ce mode de préparation. Ils ne résistent pas mieux aux manipulations qu'exigent les tissus pour les coupes en séries; on ne peut les soumettre à d'autres méthodes de coloration que celles que l'on emploie pour le protoplasme vivant. (LAURENT, *l. c.*)

Nous trouvons page 16 une autre preuve de cette interprétation, c'est la formation de tubes analogues dans les cultures qui renferment une dose exagérée de saccharose; la seule différence qu'ils présentent avec le pseudo-mycélium consiste dans une question de volume. Colorés par la fuchsine de Ziehl, ils ont l'aspect de gros tubes opaques qui sillonnent dans toutes les directions la fine membrane qui se forme après eux au fond du vase de culture. Si on décolore convenablement à l'alcool, ces tubes deviennent plus transparents, et l'on peut distinguer nettement les coccobacilles qui les remplissent (fig. 4, pl. I).

1. *Comptes rendus*, t. CXI, p. 926.

IV

LE MICROBE DES NODOSITÉS ET L'AZOTE MINÉRAL

Les nitrates et les sels ammoniacaux constituent des aliments pour les microbes des nodosités, comme l'ont établi MM. Frank, Prazmowski, Beyerinck et Laurent.

Le développement est cependant assez médiocre dans les solutions purement minérales, additionnées de 1 0/00 de sulfate d'ammonium, même placées en couche mince dans des ballons plats; les microbes se déposent en cercle dans les parties déclives, et forment une légère couche pulvérulente, facile à mettre en suspension. La liqueur ne prend jamais une consistance visqueuse; le saccharose se retrouve presque intact au bout de quinze jours.

Si on remplace le sel ammoniacal par de l'azotate de sodium à poids égal, il se forme au bout de quinze jours une membrane de fond, et le liquide prend une légère viscosité.

La supériorité de l'azote nitrique sur l'azote ammoniacal s'observe également dans un bouillon formé d'une décoction de terre additionnée de 3 0/0 de saccharose et de 1 0, 00 de sulfate d'ammonium ou de nitrate de sodium.

Dans le milieu nitré, le développement se fait régulièrement; il se forme une membrane assez épaisse; le liquide devient visqueux; le saccharose est consommé, et les cultures accusent un léger gain d'azote au bout de 30 jours.

Dans le bouillon ammoniacal on observe seulement, pendant les 4 premiers jours, un dépôt pulvérulent; puis à partir de cette époque, on voit poindre à la surface de ce dépôt quelques zoogléées sphériques, d'une couleur blanche, adhérant très peu au fond du vase et s'étirant par la moindre agitation en longs filaments visqueux; ces flocons augmentent peu à peu de volume et se fondent les uns dans les autres; ils sont constitués par un long bacille vacuolaire qui donne des cultures ordinaires sur gélose. Quelque temps après l'apparition des zoogléées, on voit se former une légère membrane; le liquide prend une consistance un peu visqueuse; mais, après 30 jours de culture, le saccharose a très peu diminué et le gain d'azote est nul.

Les 50 c. c. de décoction de terre qui constituaient les milieux de culture renfermaient 0^{mgr}79 d'azote total provenant du sol ; le bouillon nitré ne donnait plus de coloration à la diphénylamine à la fin de l'expérience : le milieu ammoniacal se colorait très nettement au réactif de Nessler.

L'ammoniaque, même en présence de quelques traces d'azote organique, constitue donc un aliment très médiocre pour les microbes des nodosités ; ceux-ci poussent aussi bien dans de l'eau de terre pure additionnée de quelques millièmes de saccharose.

Ils se multiplient également dans de la terre stérilisée et dépourvue de nitrates, mais il semble qu'ils soient incapables d'enrichir la terre en azote. Voici les résultats que j'ai obtenus en cultivant les microbes des nodosités dans 50 grammes de terre sur le fond d'un vase à deux tubulures, constamment traversé par un courant d'air lent. Cette terre avait été préalablement lavée pour la débarrasser des nitrates.

L'analyse de l'azote total a fourni les chiffres suivants pour un gramme de terre bien desséchée à 100°.

Terre avant l'expérience.....	7 ^{mgr} 03
Terreensemencée avec le bacille des légumineuses...	6 ^{mgr} 5

Cette culture a duré trois mois, le bacille avait conservé au bout de ce temps toutes ses propriétés ; il n'a pas donné de gain d'azote ; mais on ne peut pas considérer ce résultat comme définitif : l'échantillon de terre qui m'a servi a été pris dans l'enclos de l'Institut Pasteur ; c'est plutôt un véritable terreau. Un sol, pour s'enrichir en azote sous l'influence des microbes, doit réaliser d'autres conditions ; on les connaît suffisamment maintenant pour qu'il soit nécessaire d'y insister plus longuement.

De tout ce qui précède, on peut conclure que ces microbes peuvent vivre dans le sol ; on les trouvera surtout très nombreux dans les sols riches en matières organiques, puisque les nitrates, loin de paralyser leur développement, peuvent au besoin leur servir d'aliments.

Les botanistes et les agronomes sont cependant unanimes à constater que les nodosités sont plus nombreuses et plus grosses sur les racines des légumineuses qui poussent dans les terres pauvres. Ils attribuent ce fait à l'action des nitrates ; dans les

sols fertiles où cet engrais suffit à assurer largement l'alimentation azotée de la plante, celle-ci peut se passer du secours des microbes et résiste à leur envahissement.

Les mêmes observations peuvent se faire avec des plantes cultivées dans des solutions nutritives stériles. Il y a même plus : quelques auteurs ont remarqué que les tubercules radicaux exercent une influence contrariaute sur le développement des légumineuses en présence des nitrates ¹.

On a interprété ces faits de la façon suivante : les légumineuses renferment un composé capable de se combiner aux nitrates, et d'empêcher ensuite le développement du bacille des nodosités. (LAURENT, *loc. cit.*) Celui-ci assimilerait également les nitrates aux dépens de la plante, et par suite la gênerait dans son développement. (NOBBE, *loc. cit.*)

Nous allons essayer à notre tour d'élucider la question ; mais auparavant, nous devons établir encore quelques faits nouveaux.

V

ACTION DES RACINES DES LÉGUMINEUSES SUR LES FORMES LIBRES DES MICROBES DES NODOSITÉS

Les microbes des nodosités sont très mobiles ; pour observer leurs mouvements, il suffit d'examiner, en goutte suspendue, une culture sur gélose âgée de 4-5 jours, à la température de 25° environ. On les voit doués d'un mouvement de translation très rapide, qu'ils conservent très longtemps en chambre humide. Au-dessus de 25°, la mobilité est beaucoup moins générale ; on ne l'observe plus à 30°, ni au-dessous de 15°.

Le bacille des légumineuses est donc capable d'obéir promptement à des actions chimiotaxiques.

A l'origine de mes recherches, j'ai fait un grand nombre d'inoculations sur des plantes végétant en solutions stériles, dans le but de vérifier la nature du microbe que j'avais isolé des

1. NOBBE. *Versuchsstationen*, 1896. — SCHRIBAUX. *Agriculture pratique*, 1897. t. I, n° 23.

tubercules. Je n'ai pas tardé à remarquer que ceux-ci se forment toujours, non pas sur les racines anciennes, mais sur les portions de racines qui se sont développées après l'introduction des bacilles dans les solutions nutritives. Cette particularité attirera tout de suite mon attention. Essayons d'en découvrir la cause.

Pour montrer que ce sont les extrémités des racines qui attirent les microbes des nodosités, prenons 5 jeunes plants de pois que l'on a fait germer en milieu stérile. Ils ont deux ou trois feuilles, et leurs racines principales ont en moyenne 15 centimètres de long. Coupons ces racines de façon à supprimer la région des poils absorbants, et introduisons-les sur une longueur d'environ 5-6 centimètres dans une dilution de culture pure du microbe des nodosités, contenue dans une poche de collodion hermétiquement fermée avec un tampon de la même substance, et bien lavée dans de l'eau distillée. Le liquide de la dilution est identique à la solution nutritive dans laquelle on fait pousser les plantes.

Les résultats de cette expérience sont les suivants : toutes les fois que la portion de racine principale enfermée dans la poche de collodion donne naissance à des racines latérales, celles-ci sont couvertes de tubercules, la première n'en porte jamais, malgré la section qu'on y a pratiquée. Il semble donc que les parties jeunes des racines et plus particulièrement les régions pilifères attirent seules les microbes, et que l'infection de la plante soit provoquée par une substance quelconque qui diffuse à travers les membranes, à la façon par exemple de la sécrétion acide des poils absorbants.

L'action attractive des régions pilifères peut encore être mise en évidence de la façon suivante : Faisons germer quelques pois à l'abri des microbes et transplantons-les dans la terre, bien arrosée, lorsqu'ils portent trois ou quatre feuilles ; au bout de trois semaines environ, ils ont donné trois ou quatre nouvelles feuilles ; arrachons-les et examinons leurs racines ; celles qui étaient formées avant le repiquage ne portent aucun tubercule ; toutes celles qui se sont développées dans le sol en sont pourvues.

Ceci étant établi, il y a lieu de se demander quelle est la substance qui entre en jeu dans ce phénomène de chimiotaxie :

Les hydrates de carbone s'imposent à l'attention en raison de la place si importante qu'ils tiennent dans l'histoire des microbes des nodosités. De plus, on les rencontre dans la sève de tous les végétaux.

On n'a pas montré jusqu'ici, du moins à ma connaissance, qu'il s'en élimine aux extrémités des racines. Dès qu'ils se répandent dans la terre ou dans les solutions nutritives où l'on fait végéter des plantes, ils deviennent la proie des microbes. Il faut donc les rechercher dans les milieux stériles où l'on fait germer des graines.

Prenons quelques lots de dix semences de vesce de Narbonne bien stérilisées; plaçons-les, dans un vase d'Erlenmeyer, sur une couche de coton recouvrant des fragments de verre immergés dans de l'eau distillée, le tout préalablement stérilisé à 120°.

Sur ce nombre de récipients, quelques-uns sont toujours contaminés par des germes apportés par les graines; on les rejette.

Quand les jeunes plantes ont formé une ou deux feuilles, on change le liquide des ballons et on le remplace par de l'eau distillée stérile. On fait cette opération tous les deux ou trois jours en s'assurant avant chaque prise, par desensemencements sur gélose, que les cultures ne sont pas contaminées. On soumet au fur et à mesure le liquide recueilli à une ébullition prolongée, afin d'être toujours sûr de le conserver à l'abri des microbes.

Au bout de quinze jours, on a accumulé ainsi un demi-litre d'eau de germination. Cette eau évaporée à 30 ou 40°, bouillie avec une goutte d'acide chlorhydrique, et essayée par la liqueur de Fehling, donne un précipité d'oxydure de cuivre caractéristique de la présence d'hydrates de carbone ¹.

¹ Je me suis proposé de déterminer par le même procédé la nature de l'acide mis en liberté par les racines; dans ce but, j'ai évaporé à sec 200 c. c. d'eau de germination; l'extract a été épuisé par l'éther.

Celui-ci évaporé à son tour laisse au fond de la capsule un enduit liquide presque imperceptible, fortement acide au papier de tournesol; on le redissout dans de l'eau distillée, on fait agir à l'ébullition de l'oxyde de zinc pur préparé au laboratoire, on filtre, et on fait évaporer très lentement dans un verre de montre, à l'abri des poussières. Le récipient se recouvre de fines stries concentriques dans lesquelles on distingue au microscope de petites aiguilles enchevêtrées, caractéristiques du lactate de zinc.

L'extract épuisé par l'éther, redissous dans deux ou trois centimètres cubes d'eau distillée, n'est plus acide.

Nous avons donc le droit de rechercher si les hydrates de carbone, les plus communs dans le règne végétal, exercent une action chimiotaxique sur le bacille des légumineuses.

Je me suis servi, pour faire ces recherches, d'un tube à essai de 20 centimètres de longueur sur deux de diamètre, divisé en deux compartiments par une cloison en verre; le compartiment supérieur à 8 centimètres de hauteur, l'inférieur en à 12. Celui-ci porte une tubulure latérale, de même diamètre que le tube principal; elle est fixée au-dessous de la cloison. On la ramène, par une courbure convenable, dans la position verticale; son ouverture se trouve dans le même plan que celle du tube. Un tube capillaire très fin, d'une longueur de 8 centimètres, fixé à la cloison au moyen d'une soudure intérieure, met les deux chambres en communication. Son extrémité supérieure affleure de quelques millimètres au-dessus de la cloison. L'autre extrémité porte une courbure dont la petite branche a 5 millimètres de longueur. On souffle une ampoule au tiers inférieur; elle a un diamètre de 8 à 10 millimètres.

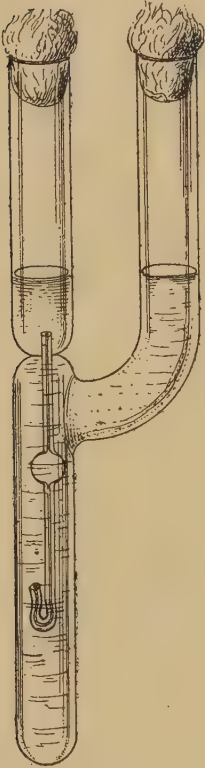


Fig. 1.

Remplissons cet appareil d'un liquide stérile, de façon à faire affleurer la surface libre à une hauteur de 2 centimètres environ au-dessus de la cloison. Plaçons, dans la chambre supérieure, une trace d'un corps soluble convenablement choisi, et laissons tomber dans la chambre inférieure, par la tubulure latérale, deux gouttes d'une dilution de culture jeune sur gélose d'un microbe mobile, faite avec un liquide identique à celui qui remplit l'appareil. Si la substance qui diffuse à travers la colonne liquide du tube capillaire exerce une attraction sur les microbes, ceux-ci pénétreront dans le tube et montent peu à peu dans la chambre supérieure où la concentration du liquide est la plus forte.

On pourra y constater leur présence en faisant, à des inter-

valles de temps plus ou moins espacés, desensemencements sur gélose avec des prises de liquide.

L'ampoule du tube capillaire et la position latérale de son ouverture inférieure ont pour but d'empêcher le passage accidentel des microbes dans la partie supérieure du grand tube, par un entraînement de liquide occasionné soit par les chocs, soit par une légère dénivellation des deux surfaces libres.

J'ai fait un grand nombre d'essais avec le microbe des nodosités et les hydrates de carbone. Comme milieu, j'ai employé de l'eau physiologique, du bouillon de haricots et de l'eau de terre. C'est ce dernier liquide qui m'a fourni les meilleurs résultats.

J'ai fait agir le saccharose, le glucose, l'amidon soluble, et de l'eau distillée stérile dans laquelle avaient germé des semences de vesce de Narbonne; chacune de ces substances était répartie dans trois tubes à raison de quatre gouttes d'une solution à 2 % dans chaque tube; dans chacun d'eux on introduisait ensuite deux gouttes d'une dilution, dans de l'eau de terre, de culture sur gélose âgée de deux jours. On opérait en même temps sur trois tubes témoins qui ne recevaient que des microbes. Inutile d'ajouter que toutes ces opérations exigent l'emploi de milieux stériles et des cultures pures. Elles ont été faites à une température moyenne de 23-25°.

Deux chiffres permettent d'apprécier l'action exercée par chacune des substances employées : 1° le temps que les microbes mettent à franchir une colonne liquide de 8 centimètres; 2° le nombre des microbes qui franchissent ce trajet dans un temps donné.

Je n'ai employé que le premier procédé, car les hydrates de carbone favorisent la multiplication des microbes, et la question de numération s'en trouve faussée.

En faisant des prises de semence toutes les quatre heures, j'ai constaté de cette façon que les tubes qui ont reçu du saccharose et du glucose donnent tous régulièrement des ensemencements positifs au bout de 8 heures. — Les tubes témoins ne donnent des résultats qu'au bout de 12 heures; ils sont tous fertiles au bout de 16 heures. Les tubes additionnés d'amidon soluble ne présentent qu'une légère avance sur les tubes témoins. Ceux qui ont reçu de l'eau de germination accusent générale-

ment un léger retard sur les témoins ; les prises de liquide ne donnent pas toujours des ensemencements positifs après seize heures.

En résumé, les résultats sont les suivants : les hydrates de carbone attirent les microbes des nodosités ; l'eau de germination semble les repousser.

La raison de cette contradiction n'est pas difficile à découvrir ; l'eau de germination est légèrement acide, et, de plus, elle ne contient que des quantités infinitésimales d'hydrates de carbone. Si l'action des acides n'est pas éliminée par la réaction alcaline des milieux, elle se traduira toujours par un retard très sensible, car les acides, employés à raison de deux ou trois gouttes d'une solution à 1/1000 par tube, suffisent pour conserver la stérilité du liquide des chambres supérieures pendant plus de 24 heures. Quelquefois, les prises de semence redeviennent stériles après avoir donné des résultats positifs. Si l'alcalinité de l'eau de terre, par exemple, est suffisante pour neutraliser l'acidité de l'eau de germination, on constate encore que les microbes ne parviennent pas, dans la partie supérieure des tubes, plus vite que dans les témoins. Il faut donc admettre que les racines des légumineuses n'émettent pas, abstraction faite des hydrates de carbone, une substance spécifique capable d'exercer une action chimiotaxique sur les microbes du sol.

Nous aurions pu étudier aussi l'action de quelques sels, en particulier des nitrates, car on se rappelle que nous nous sommes proposé d'expliquer l'influence de ces corps sur la formation des tubercules radicaux. Mais l'explication découle tout naturellement de ce qui précède. Nous n'avons qu'à nous rappeler le rôle physiologique des nitrates dans l'organisme des végétaux ; MM. Lœw¹ et Otto² ont démontré qu'ils sont utilisés dans les feuilles principalement et dans tous les organes en voie de développement. Ils se combinent aux produits résultant de l'assimilation chlorophyllienne pour former des corps quaternaires.

En nous appuyant sur ces observations, nous pouvons affirmer que si la plante trouve dans le sol assez de nitrates pour absorber les hydrates de carbone élaborés par les organes verts, la sève descendante n'en renfermera que très peu, et, par suite, les poils

1. Compte rendu dans les *Annales agronomiques*, t. XVI.

2. *Ber. d. d. bot. Gesellsch.*, t. VIII.

absorbants n'en perdront pas par diffusion; les microbes du sol ne seront pas attirés et il ne se formera pas de nodosités. C'est le cas des terres riches. Les rares tubercules qui peuvent se développer restent chétifs parce qu'ils sont dépourvus d'aliments hydrocarbonés. Au contraire, si le sol renferme peu de nitrates, les hydrates de carbone circulent dans toutes les parties de la plante parce qu'ils sont en excès sur les aliments azotés; ils parviennent ainsi vers les extrémités végétatives des racines, et de là se répandent dans la terre. Les bacilles des légumineuses, attirés par la présence de cet aliment, envahissent les régions pilifères, parce que c'est dans l'intérieur même des cellules que les liquides sont le plus riches en hydrates de carbone, car, évidemment, les mêmes phénomènes que nous avons observés avec nos tubes à chimiotaxie se passent dans la nature.

Nous voyons donc que la question de la symbiose des légumineuses est réglée d'un bout à l'autre par le jeu naturel et simple des forces physiques que la vie met continuellement en action. Les plantes vertes disposent, dans les radiations solaires, d'une source d'énergie inépuisable; mais elles ne peuvent l'utiliser pour triompher de l'inertie de l'azote. On a vu par quel mécanisme les légumineuses y parviennent; grâce à cette propriété, elles sont aussi intéressantes au point de vue biologique qu'au point de vue agricole. Elles peuvent, suivant les conditions, vivre de la vie indépendante des autres plantes supérieures, ou de la vie saprophyte par l'intermédiaire des bacilles, ou bien encore des deux simultanément.

Cette dernière remarque nous permet d'aller au-devant d'une objection qui se présente ici : l'émission d'hydrates de carbone n'est pas particulière aux légumineuses, car ces composés se rencontrent dans tous les végétaux; pourquoi n'y a-t-il pas symbiose avec d'autres plantes? Remarquons que le caractère spécifique des légumineuses ne réside pas dans cette propriété de diffuser des hydrates de carbone, mais bien dans la faculté d'utiliser directement les composés quaternaires fabriqués par les microbes des nodosités aux dépens de l'azote libre.

Toutes les plantes privées de cette propriété se conduisent, vis-à-vis du bacille des nodosités, comme elles se conduisent à l'égard d'un microbe quelconque; elles se défendent par tous les moyens dont elles disposent.

VI

CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE

Les microbes des nodosités fixent l'azote libre sans le secours de la plante; il suffit pour cela de les placer dans les conditions les plus favorables à leur développement. Nous avons montré qu'il faut aérer énergiquement les cultures et introduire dans les milieux nutritifs une quantité de saccharose qui ne peut pas être inférieure à 2 0/0.

Le bacille se montre assez exigeant sur la nature de l'azote organique; la légumine lui convient très bien; elle permet au bacille d'utiliser le mieux possible l'énergie latente du saccharose en vue de la fixation de l'azote libre. C'est dans ces conditions seulement qu'il se montre capable de faire la synthèse d'une quantité appréciable de matière azotée.

Le rapport qui existe entre l'azote combiné et le sucre fourni aux microbes influe sur le résultat final. Celui qui nous a donné le meilleur rendement est $1/200$; nous avons plus que doublé la richesse en azote des milieux de culture; le rapport de l'azote fixé au sucre consommé est sensiblement supérieur à $1/100$. C'est à peu près le rapport qui existe entre l'azote total et le saccharose dans une betterave à sucre. De cette comparaison, nous avons pu conclure que la fixation de l'azote libre dans nos cultures a été à peu près aussi active que dans les nodosités.

Dès le début de nos expériences, notre attention a été vivement frappée par l'abondance de la mucosité qui se forme dans les cultures; nous avons établi qu'elle ne résulte pas d'une transformation isomérique du saccharose; nous avons constaté qu'il y a une relation étroite entre la quantité d'azote fixée et l'abondance de cette substance dans les cultures; sa solubilité dans l'eau, sa propriété de passer à travers les membranes, son absence dans les nodosités, bien que les bacilles transportés sur des milieux artificiels en élaborent dans les 24 heures, nous ont conduit à la considérer comme une matière azotée provenant de la fixation de l'azote libre, et servant de trait d'union entre

la plante et son hôte. Pour le microbe, c'est un produit de désassimilation, et c'est pour cela précisément que le bacille des nodosités ne peut pas se développer si on ne lui fournit que de l'azote libre. Pour la plante, au contraire, c'est un élément directement assimilable.

En rapprochant les observations de MM. Prązmowski et Prillieux, nous avons pu établir que le pseudo-mycélium des jeunes nodosités n'est pas une forme de transition du microbe des légumineuses. Il résulte d'une accumulation de mucosité autour des coccobacilles qui envahissent les cellules, il disparaît dès que la circulation est assez active pour dissoudre et entraîner cette substance. Ce n'est qu'à partir de ce moment seulement que les formes ramifiées se montrent : nous verrons sous quelles influences elles naissent, en même temps que nous compléterons, dans la seconde partie de ce travail, l'histoire des microbes qui pénètrent dans les racines.

Pour le moment, rappelons que nous avons obtenu dans nos cultures des formations analogues sinon identiques. Rappelons également que ce pseudo-mycélium ne résiste pas aux procédés de préparation microscopique employés pour tous les autres microorganismes. Nous compléterons aussi cette dernière remarque.

L'utilisation du nitrate par les microbes des nodosités nous prouve que la rareté des tubercules radicaux sur les racines des plantes cultivées dans les sols riches en matières azotées n'est pas due à une influence nocive exercée par ces produits sur le développement des microbes. Nous avons montré qu'elle est la conséquence d'une double cause : l'action attractive exercée par les hydrates de carbone mis en liberté dans la région des poils absorbants, et l'influence mutuelle que ces composés et les azotates exercent les uns sur les autres dans les tissus mêmes de la plante.

DEUXIÈME PARTIE

Morphologie du microbe des nodosités.

Dans le cours des recherches précédentes, qui ont surtout porté sur le côté chimique de la fixation de l'azote, je n'ai rencontré pendant longtemps que la forme bacillaire mobile des microbes des nodosités. Les auteurs ont décrit des formes ramifiées, des formes en étoile associées aux bacilles. Je ne les ai vues apparaître qu'en présence d'un taux élevé de chlorure de sodium ou d'une dose exagérée de saccharose. Ce caractère accidentel semble traduire des conditions de développement défavorables.

Je me suis proposé de préciser ces conditions et d'essayer en même temps d'obtenir les formes en poire que l'on rencontre dans les nodosités de trèfle.

Dans ce but, j'ai eu recours : 1° à l'action de la chaleur ; 2° aux milieux acides.

Action de la chaleur. — M. Laurent a fixé à 30° la température limite du développement des microbes des nodosités. Cependant, si on fait desensemencements abondants, ils poussent encore à 35° sur gélose¹ ; ils s'habituent même assez vite à cette température.

Si on réensemence toutes les 48 heures les cultures exposées pendant quelques jours à 35°, on observe, dès le deuxième passage, dans les cultures âgées de 24 heures, de nombreux bacilles pourvus de bourgeons latéraux ; ces ramifications disparaissent dans les cultures âgées de 3 jours, lorsque la mucosité est déjà abondante.

A partir du deuxième passage, les formes rameuses deviennent de plus en plus nombreuses ; elles diminuent ensuite et dispa-

1. La gélose dont il est question dans toute la dernière partie de ce travail a été faite avec du bouillon de haricots additionné de 3 0/0 de saccharose.

raissent complètement lorsque le microbe s'est adapté à la température de 35°. C'est dans les cultures de 24 heures qu'elles sont le plus nombreuses. Les figures 1 et 2, Pl. II, donnent une idée de leur richesse et de leur abondance. Comme on le voit, les bacilles s'allongent et forment un grand nombre de bourgeons; si on dilue un peu de ces cultures riches en formes ramifiées dans de l'eau physiologique ou du bouillon de haricots stérile, on les voit se désagréger rapidement et donner naissance, par voie de division transversale, à des éléments simples. La fig. 3, Pl. II, représente deux de ces formes à deux stades différents de division. Les rameaux prennent naissance en un point de l'axe principal et grandissent comme les bourgeons ordinaires; il n'y a donc pas, chez les microbes des nodosités, de division longitudinale.

Action des acides. — Les microbes ne se cultivent pas dans le bouillon de haricot, lorsqu'on l'additionne de 1/1000 d'acide tartrique; les germes déposés dans ce milieu ne se régénèrent plus au bout de 2 à 3 semaines, lorsqu'on les transporte sur des milieux alcalins.

Ils se développent sur gélose additionnée de 1 0/00 d'acide tartrique ou oxalique¹, à condition, toutefois, d'ensemencer très abondamment. Dès la première culture sur ce milieu, les bacilles donnent naissance à des formes en poire, à la température de la chambre; leur contenu est vacuolaire, leur diamètre atteint 2-3 μ , quelquefois plus (fig. 2, Pl. I).

Ces métamorphoses sont générales lorsque l'ensemencement est pauvre; mais si on transporte beaucoup de mucosité, la transformation est limitée à la minorité des microbes; dans le premier cas, le développement s'arrête au bout de 3 ou 4 jours et les formes en poire persistent dans la culture, tandis qu'elles sont passagères lorsque la mucosité envahit toute la surface de la gélose.

Si on combine l'action de la température de 35° avec l'influence des milieux acides, les résultats sont différents: les bacilles s'allongent, se renflent en chapelets et se ramifient. Tous se transforment; il est impossible de trouver dans les cultures un bacille normal; l'organisme qu'on obtient ainsi présente la

1. L'acidité n'atteint pas le chiffre de 1/1000, car la gélose étant préparée avec une eau légèrement calcaire, une partie de l'acide se trouve neutralisée.

plus grande analogie avec des fragments de mycélium âgé d'une culture d'oospora (fig. 3, Pl. I).

Mais il est impossible de fixer ces formes ; elles disparaissent au bout de quelques jours dans la culture même, lorsque la mucosité devient assez abondante ; si on les transporte sur gélose alcaline, elles se désagrègent très vite, et au bout de 24 heures on obtient un bacille typique, chez lequel rien ne trahit les modifications que ses ancêtres ont subies.

On obtient encore des formes analogues à celles de la fig. 3, Pl. I, lorsqu'on ensemence sur de la gélose de viande peptonisée un microbe habitué au bouillon de haricots sucré.

Rien n'est donc plus facile que d'obtenir sur des milieux artificiels des formes aussi variées que celles que l'on rencontre dans les nodosités. On ne peut pas attribuer celles-ci à l'action d'une température exagérée, mais il est clair qu'elles s'expliquent par l'influence de l'acidité de la sève.

La plante n'exerce aucune action spécifique en dehors de celle des acides ; j'ai déjà dit que les microbes pénètrent dans les racines sous forme de coccobacilles (V. p. 24) ; ils y conservent cet état tant que la sève ne circule pas en abondance dans le tubercule ; mais lorsque les vaisseaux sont formés dans cette région, le liquide nourricier dissout la mucosité protectrice qui englobe les microbes ; à partir de ce moment, ils nagent dans un liquide acide constamment renouvelé, et c'est alors que les formes rameuses apparaissent ; elles persistent aussi longtemps que dure la vie dans ces régions.

Autres formes physiologiques. — L'histoire morphologique des microbes des nodosités ne se borne pas à ce que je viens d'exposer. Pour observer les formes si variées que je viens de décrire, il faut faire usage de cultures récemment tirées de la pulpe de jeunes tubercules. Les cultures d'origine ancienne présentent aussi un certain nombre de particularités intéressantes que je vais passer maintenant en revue.

J'ai montré que le microbe des légumineuses ne se développe pas dans une atmosphère d'azote pur ; il y conserve cependant assez longtemps sa vitalité ; et si, au bout de 15 jours ou 3 semaines, on le reprend dans les tubes scellés pour l'ensemencer sur des tubes ordinaires, il donne de petites colonies grisâtres, constituées par une forme à peu près ronde, de très

petit diamètre. En goutte suspendue, ces microbes se présentent soit à l'état isolé, soit réunis par deux ou disposés en chaînes.

Ce résultat, obtenu dans une première expérience, laissait place au doute; il a été vérifié immédiatement dans une autre expérience faite avec des cultures dont la pureté avait été préalablement contrôlée.

La forme ronde a repris son aspect primitif au bout de quelques passages sur gélose, mais je n'ai pas réussi à lui faire produire de mucosité. Avec les cultures récentes on n'obtient pas ces transformations. Ensemencées dans une atmosphère d'azote, elles se comportent comme les cultures d'origine ancienne; mais les germes repris dans les tubes fermés, plusieurs semaines plus tard, ont conservé leurs propriétés caractéristiques.

Ceci prouve que les cultures entretenues par des rajeunissements répétés se différencient peu à peu sur milieux artificiels.

Si on en prend une appartenant à la même série que celles qui ont servi dans l'expérience précédente, et si on l'ensemence de façon à obtenir des colonies séparées, voici ce qu'on observe : au bout de deux ou trois jours, on voit apparaître une série de colonies blanches, nacrées, étalées sur le milieu; elles atteignent facilement 3-4 millimètres de diamètre. Puis, un à deux jours après, une autre série de colonies se forme; celles-ci sont plus proéminentes, légèrement jaunâtres; leur diamètre reste toujours inférieur à celui des premières. Les deux espèces de colonies renferment deux bacilles qu'il est impossible de distinguer lorsqu'ils sont intimement mélangés; mais quand on est prévenu, on remarque que les colonies jaunâtres sont constituées par un microbe dont le contenu présente de petites vacuoles.

Ensemencés séparément, ces deux bacilles ne fabriquent pas de mucosité; si on les associe, ils donnent des cultures caractéristiques. Dans un même tube, des colonies séparées conservent l'aspect de colonies de microbes banaux; si deux d'entre elles empiètent l'une sur l'autre, la mucosité se forme en cet endroit, et au bout de quelques jours elle envahit toute la culture. Il est donc impossible de considérer l'une ou l'autre de ces formes comme une impureté.

Les cultures sur pomme de terre permettent de pousser la transformation encore plus loin, à condition, toujours, de se

servir de cultures d'origine ancienne : sur un fragment de pomme de terre ensemencé depuis quatre semaines, on ne trouve plus que des formes rondes. On peut suivre au microscope l'évolution des bacilles; on les voit s'allonger et se diviser peu à peu en articles courts qui deviennent indépendants les uns des autres; si on ensemence des tubes de gélose avant que la transformation ne soit complète, et si on s'arrange de façon à obtenir des colonies séparées, on peut, à un moment donné, observer des colonies de formes rondes et des colonies de formes bacillaires.

En ensemencant séparément sur pomme de terre les deux bacilles que nous avons isolés précédemment, on les voit évoluer tous deux vers la forme ronde.

Les cultures issues des colonies provenant directement des nodosités, et conservées pendant huit mois, peuvent être rajeunies au bout de ce temps; elles montrent les mêmes transformations. L'une de ces cultures m'a fourni une forme ronde et un bacille qui, ensemencés à part, ne fabriquent pas de mucosité; si on les associe, ils donnent des cultures tout à fait typiques.

Propriétés physiologiques des formes précédentes. — Les propriétés physiologiques des microbes des nodosités ne sont pas plus stables que leurs caractères morphologiques. Le bacille des légumineuses, au moment où on l'isole des tubercules, ne liquéfie pas la gélatine; les formes rondes qui en dérivent la liquéfient très rapidement, les formes bacillaires très lentement; les microbes ne troublent pas la gélatine peptonisée; ils se réunissent au fond des tubes et forment un dépôt floconneux.

Leur action sur l'azote libre ou combiné est également intéressante. Pour l'étudier, j'ai eu recours aux deux formes extraites des cultures que j'ai conservées pendant huit mois sans les rajeunir; ces deux microbes sont très différenciés, et, de plus, lorsqu'on les associe, ils exercent l'un sur l'autre une influence très remarquable.

La forme bacillaire avait acquis spontanément, pendant la belle saison, la propriété de produire de la mucosité; pour cette raison, j'ai fait deux séries d'expériences correspondant à deux états différents de ce microbe. J'ai adopté le dispositif que j'ai déjà utilisé plusieurs fois.

On a mis en expérience six ballons de culture renfermant chacun 50 c. c. de bouillon de haricots.

Le ballon n° 1 a étéensemencé avec la forme ronde.

—	n° 2.	—	—	la forme bacillaire primitive ¹ .
—	n° 3	—	—	les deux formes précédentes.
—	n° 4	—	—	la forme ronde.
—	n° 5	—	—	la forme bacillaire active.
—	n° 6	—	—	la forme ronde et la forme active.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

Cultures	Durée des cult.	Az. initial	Sucre final	S. consommé	Az. initial	Az. final	Azote gagné
n° 1	14 jours	1500mgr	1111mgr	389mgr	15mgr,8	19mgr,5	— 3mgr,7
n° 2	14	id.	891	609	17,1	id.	— 2,4
n° 3	14	id.	757,5	625	21,7	id.	+ 2,2
n° 4	29	1750	1578	172	7,9	7,1	+ 0,8
n° 5	25	id.	927	823	9,3	id.	+ 2,2
n° 6	25	id.	1128	627	9,5	id.	+ 2,4

Les chiffres fournis par les n°s 1, 2, 3, qui constituent la première série sont très instructifs. Dans les deux premières cultures il s'est produit une déperdition d'azote; on est donc ici en présence de ferments de la matière azotée; ce caractère est d'autant plus prononcé que l'on se rapproche davantage de la forme ronde. La consommation de saccharose est à peu près inversement proportionnelle à la perte d'azote; celui-ci se dégage à l'état gazeux; des barboteurs à acide sulfurique convenablement placés sur le courant d'air ne retiennent pas de trace d'ammoniaque.

Lorsque les deux formes microbiennes sont associées, les résultats sont bien différents; en 14 jours, dans un milieu trop riche en azote initial, il s'est produit un gain de 2^{mgr},2 d'azote.

L'aspect des cultures concorde bien avec ces chiffres; les vases n° 1 et 2 renferment un bouillon très fluide; les microbes forment un dépôt pulvérulent qui se réunit dans les parties les plus déclives du fond. Le contenu du n° 3 est très épais, très riche en mucosité.

Dans la deuxième série, le n° 4 a conservé sa fluidité jusqu'au

1. J'appelle forme bacillaire primitive celle qui ne produit pas de mucosité, tandis que l'expression forme active correspond à l'état sous lequel elle en donne.

20^e jour. A partir de ce moment il est devenu visqueux ; ce changement dans l'aspect de la culture a coïncidé avec l'évolution de la forme ronde vers la forme bacillaire. Lorsqu'on a mis fin à cette expérience, les tubes de gélose ensemencés avec le contenu du ballon montraient au microscope deux bacilles mobiles, légèrement différenciés ; incapables de produire de la mucosité lorsqu'ils sont séparés, ils en élaborent lorsqu'ils sont associés. De plus, ces microbes ne provoquent plus de déperdition d'azote. Cette évolution vers la forme bacillaire active s'est faite sous l'influence d'une température favorable et d'une aération très active, car pendant ce temps, les formes conservées sur gélose ne se sont pas transformées. Il faut noter également l'influence de la composition du milieu de culture, très pauvre en azote combiné et très riche en saccharose.

Les chiffres relatifs au gain d'azote correspondent assez exactement, dans les deux autres cultures, aux propriétés des microbes qu'elles renferment. Le n^o 2 a consommé plus de saccharose pour produire à peu près le même travail, l'association de deux formes exerce donc encore une influence sensible sur le résultat final.

A ces deux séries d'expériences correspondent deux séries d'inoculations faites sur des vesces de Narbonne ¹ ; les résultats obtenus dans cette voie reproduisent assez fidèlement ceux que l'analyse vient de fournir.

1. Cette légumineuse donne des nodosités 9 à 12 jours après l'inoculation. La graine est de la grosseur du pois le plus volumineux. Le testa, plus dur, permet de faire agir plus longtemps le sublimé et d'obtenir une stérilisation plus rigoureuse sans s'exposer à endommager l'embryon.

Comme mes recherches ont nécessité l'emploi d'un grand nombre de plantes poussant dans des solutions nutritives stériles, je donnerai ici le mode opératoire auquel je me suis arrêté.

Pour la stérilisation, j'ai eu recours au procédé ordinaire qui consiste : 1^o en lavages préalables à l'eau stérile ; 2^o séjour d'un quart d'heure dans le sublimé acide au 1/100, en récipient stérile ; 3^o 4 à 5 lavages à l'eau stérile en ballons stériles.

Les semences ainsi préparées sont réparties dans des tubes de 20 centimètres de longueur sur 2 de diamètre et remplis au 1/3 de leur hauteur d'eau distillée ; ces tubes sont munis de deux tampons de coton ; l'un, assez lâche, repose sur l'eau dans laquelle il est immergé en partie ; l'autre, plus serré, remplit le rôle ordinaire des tampons de coton. Le tube ainsi préparé est stérilisé à 120^o ; pour mettre la graine en germination, on la dépose avec une pince flambée sur le tampon de coton intérieur.

Au bout de 48 heures à la température de la chambre, en été, la racine sort ; elle traverse facilement le tampon de coton et va baigner dans l'eau distillée, pendant que la tige occupe le compartiment supérieur du tube ; celle-ci peut

La forme ronde et la forme bacillaire inoculées séparément ne donnent pas de tubercules. Il n'y a rien sur les racines qui rappelle les formations de cette nature ; mais les bacilles cultivent dans le feutrage des poils absorbants ; ils forment ainsi une gaine persistante qui entoure le corps de la racine et la grossit beaucoup ; on y trouve au microscope un bacille très fin, mobile, identique au point de vue de la forme à celui que l'on observe dans les jeunes nodosités à peine visibles à l'œil nu.

En fixant et en colorant la préparation, on voit, dans l'enchevêtrement des poils absorbants, des filaments fortement colorés ; en les décolorant modérément par l'alcool, on leur donne de la transparence et l'on peut distinguer nettement le bacille qu'ils renferment. La figure 6, planche I, représente un de ces filaments muqueux à un grossissement de 400 D avec quelques fragments de poils absorbants ; ils sont identiques à ceux de la figure 4 de la même planche, et comme eux ils ne diffèrent que par le volume du pseudo-mycélium qu'on observe dans les jeunes nodosités.

Les racines des plantes inoculées avec les deux formes microbiennes associées, portent de très nombreuses nodosités ; celles-ci renferment des bacilles ramifiés ; elles sont aussi volumineuses que celles que produisent, dans les mêmes conditions, les microbes sortant de la pulpe des tubercules.

La seconde série d'inoculations a donné des résultats identiques aux précédents ; cette fois, par conséquent, l'harmonie n'est pas si complète avec les indications de la chimie. La forme bacillaire active est encore impuissante à produire des nodosités.

Une question s'impose maintenant à la suite de toutes ces expériences qui se confirment mutuellement. Les microbes des

acquérir une longueur de 7 à 8 cm. et développer deux ou trois feuilles, étiolées naturellement.

Lorsqu'il y a contamination, la graine a apporté des germes qui sont surtout des spores de moisissures, de mucors principalement ; les penicilliums et les aspergillus sont plus rares ; les microbes constituent l'exception. S'il y a des impuretés, la plante se développe mal et périt le plus souvent ; dans les tubes stériles, l'eau reste parfaitement limpide et les racines sont d'un blanc d'ivoire. Lorsqu'on a bien choisi ses graines, la contamination n'atteint pas plus du 1/20 des plantes en germination.

Quand la tige a 7 à 8 centimètres de longueur, on transporte la jeune plante dans un récipient stérile muni d'une solution nutritive, en prenant toutes les précautions pour opérer ce transfert d'une manière aseptique.

nodosités appartiennent-ils à deux espèces bacillaires, ou bien toutes ces formes résultent-elles d'une évolution graduelle d'une seule et même espèce?

Il semble bien, par ce qui précède, qu'on se trouve en présence de deux espèces. Rien ne permet d'affirmer que lorsqu'on part d'une colonie obtenue avec un microbe sortant d'une nodosité, on ne prend pas, à son insu, les deux espèces simultanément; elle peuvent se confondre longtemps par leurs caractères morphologiques, puis se différencier sous l'influence des agents de transformation; et ce n'est qu'au moment où leurs caractères sont suffisamment distincts qu'on s'aperçoit qu'il y a en réalité deux espèces de formes et de propriétés bien tranchées, comme on l'a vu.

En observant attentivement le passage des formes rameuses des nodosités à la forme bacillaire des cultures, on remarque que les premières sont des colonies et non des individus. M. Franck avait déjà observé que chacune de ces formes met successivement en liberté plusieurs coccobacilles mobiles. Voici ce que j'ai vu à mon tour: les formes ramifiées des tubercules, transportées sur des tubes de gélose, se gonflent en une petite série de vésicules séparées par des étranglements qui prennent bien la couleur (fig. 1, Pl. I). Les vésicules ne se colorent pas; ce sont des vacuoles dilatées par les courants osmotiques dus au changement de milieu; elles se résorbent ou éclatent; les granules protoplasmiques, mis en liberté, donnent naissance à autant de bacilles mobiles. Nous devons donc considérer ces formes complexes comme des agrégats d'individus, et rien ne prouve *a priori* que ces colonies ne soient pas formées par deux espèces microbiennes.

Il est vrai que si nous regardons à l'autre extrémité de la chaîne que nous connaissons déjà, nous trouvons encore qu'elle se ferme par la forme ronde qui serait également commune aux deux espèces.

Pour arriver à donner une solution nette de cette question, j'ai cherché dans une autre voie. J'ai transformé à la température de 35° des cultures d'origine très récente, par une série de réensemencements effectués toutes les 48 heures sur gélose acide. Ces cultures, conservées ensuite à la température de la chambre sur milieu alcalin, donnent, au bout de 15 jours,

deux sortes de colonies ; les unes normales, les autres blanches, nacréées, luisantes; ensemencées séparément et portées brusquement sur gélose acide à la température de 35°, elles donnent les unes et les autres des formes ramifiées.

Inoculées séparément ou ensemble, elles produisent dans tous les cas, au bout de 12 à 15 jours, de nombreux tubercules radicaux. On ne peut plus admettre après tous ces passages que chacune des colonies séparées dans la suite soit formée par deux germes d'espèces différentes. Il faut donc considérer toutes les variétés de microbes qui ont été examinées jusqu'ici comme des modifications d'une espèce unique.

Conclusions. — La série de faits que je viens d'exposer entraîne un certain nombre de conclusions.

Ce qui frappe tout d'abord, c'est la variété des formes que l'on peut obtenir sur les milieux artificiels ; mais il faut se hâter d'ajouter que, dans l'intérieur même des nodosités, ils opèrent des transformations analogues.

Lorsqu'on examine le contenu de ces organes épuisés, on ne trouve plus que des formes bacillaires ou des formes rondes qui n'offrent aucune parenté apparente avec les microbes ramifiés si caractéristiques des jeunes tubercules. M. Laurent les considère comme des formes saprophytes du sol attirées dans ces régions par l'abondance de la nourriture. Elles donnent, en effet, très rarement, des tubercules par inoculation et, de plus, leurs cultures ne présentent plus les caractères des bacilles typiques. Comme les expériences précédentes montrent que le microbe des nodosités peut perdre toutes les propriétés qu'on est convenu de regarder comme caractéristiques, on peut, en groupant les faits épars dans la première partie de ce travail, donner une interprétation des transformations qui ont leur siège dans les tubercules mêmes.

J'ai déjà montré comment se fait l'infection, comment naissent et disparaissent les tubes muqueux, et sous quelles influences les formes rameuses succèdent aux coccobacilles. Si on reprend maintenant les tubercules à un âge plus avancé, on assiste à leur épuisement graduel par le retrait de la sève. Mais avec la disparition du liquide nourricier, l'acidité cesse également son action. Les microbes peuvent faire retour à la forme simple, et comme ils ne reçoivent plus d'aliments tout préparés,

Il s'agit maintenant d'isoler les espèces qui peuplent ces cultures, et d'y caractériser, si possible, le microbe des nodosités.

La culture A m'a fourni trois espèces : deux bactéries sporogènes et un bacille représenté sur six tubes par trois colonies; les colonies de bactéries sont beaucoup plus nombreuses; l'une d'elles, que j'appelle *a*, présente un aspect particulier; elle s'étend à la surface de la gélose, en donnant des arborescences tout à fait comparables à celles que l'eau congelée forme sur les vitres. L'autre bactérie donne des colonies riches et chagrinées; elle n'offre aucun intérêt.

Le bacille forme des colonies proéminentes, pâteuses, qui s'étalent en vieillissant; je l'appelle *b*.

La culture B renferme un plus grand nombre d'espèces; je n'en ai conservé qu'une seule, un bacille très mobile assez semblable comme aspect au microbe des nodosités.

Les microbes *a* et *b* attirent l'attention par la régularité avec laquelle ils se succèdent dans la culture; j'ai déjà dit que la bactérie apparaît la première, envahit tout le tube, et donne des spores; puis le bacille *b* se développe à son tour, et dans la culture de huit jours, il semble qu'il soit seul; on ne trouve plus ni spores ni bactéries. En séparant les espèces contenues dans une culture âgée, afin d'être plus sûr d'obtenir les microbes producteurs de mucosité, je n'ai obtenu que 3 colonies de bacille *b*. Ceci m'a fait penser que la bactérie *a* doit présenter un stade bacillaire qui ne serait autre que *b*.

Pour établir les relations qui existent entre ces deux formes, j'ai isolé à nouveau la bactérie *a* du sol. Rien n'est plus facile : cette bactérie est très répandue à la surface de la terre arable; et comme elle se reconnaît facilement à son mode de développement, on l'obtient à l'état de pureté au bout de sept ou huit jours. Voici comment : on prend un fragment de colonie, on le dépose au milieu d'un tube de gélose. En moins de 48 heures, la bactérie s'est propagée à plus de 2 centimètres du point d'origine; on détache un fragment périphérique qu'on dépose sur un autre tube. En répétant cette opération trois ou quatre fois, on est parfaitement sûr d'avoir éliminé toutes les impuretés. En culture pure, la bactérie *a* donne de longs filaments qui rayonnent en tout sens, se croisent et se groupent en faisceaux visibles à l'œil nu, légèrement proéminents et adhérant fortement

à la gélose ; des filaments diffus et nuageux pénètrent dans le substratum et l'envahissent lentement. Au bout de 24 heures, les filaments les plus âgés renferment déjà des spores. Après 3 à 4 jours, ces spores germent en donnant naissance à des filaments analogues aux premiers, mais plus courts et plus gros, la culture revêt alors un aspect humide et se laisse détacher assez facilement de sa gélose. Cette seconde génération sporule très lentement à son tour, et les spores une fois formées se conservent indéfiniment. Ce n'est pas là le seul processus de reproduction que les formes courtes présentent. Au bout de quinze jours on voit poindre un peu partout de petites colonies laiteuses qui augmentent de volume ; elles sont fournies par un bacille court, noyé dans une mucosité abondante. Si on ensemence une parcelle de ces colonies, on n'obtient que la forme bactérienne et le processus recommence.

On peut l'activer par la chaleur, par l'emploi des milieux acides placés à 35°, et aussi par la concurrence vitale, comme cela se passait dans la culture A.

Les formes courtes, avant de se résoudre en coccobacilles, présentent dans chaque article une, deux ou trois condensations protoplasmiques, suivant la rapidité de la transformation. Ces granulations absorbent peu à peu la masse de la bactérie, et, une fois indépendantes, elles se reproduisent sur place en donnant des colonies laiteuses. La fig. 9, Pl. II, représente cette évolution, et la fig. 6, Pl. II, reproduit les coccobacilles libres.

La forme bacillaire ne se fixe qu'à la longue, et c'est pour cela, précisément, que les colonies du bacille *b* étaient si rares alors qu'on s'attendait à n'obtenir qu'elles. Le bacille *b* est en effet le stade dissocié et mobile de la bactérie *a*. En partant d'une culture pure de cette dernière, on arrive à obtenir en huit jours des cultures identiques comme aspect à celles que l'on obtient en ensemencant directement le bacille *b*. Dans les deux cas la mucosité est abondante, d'une couleur rosée quand elle est épaisse, et virant au rouge orangé par la dessiccation ¹.

1. Donnons en passant les caractères que présente la bactérie *a* sur quelques milieux de culture. Ce qui précède se rapporte à la gélose de haricots.

Sur gélose de viande elle est beaucoup plus stable.

Dans les bouillons, elle forme des zooglées hyalines qui restent longtemps en suspension dans le liquide. Au bout de plusieurs semaines elles se désagrègent et tombent au fond des récipients en formant un dépôt pulvérulent, renfermant des bacilles fins et des spores.

Ceci étant établi, nos investigations se borneront désormais à identifier les deux bacilles *b* et *c* avec le microbe des nodosités. Tous deux produisent une mucosité abondante, légèrement lactescente avec *b*, et très hyaline avec *c* : le plus souvent, la mucosité fabriquée par le bacille authentique est intermédiaire entre les deux. On sait en outre que celui-ci ne liquéfie pas la gélatine, qu'il possède un stade ramifié qui apparaît dans des conditions déterminées, qu'il fixe de l'azote dans les milieux de culture, et enfin qu'il produit des tubercules par inoculation aux légumineuses.

Voyons si les bacilles *b* et *c* possèdent ces propriétés.

Culture sur gélatine. — *b* liquéfie la gélatine d'une façon irrégulière; si on l'ensemence en stries, il se développe une trainée grisâtre très proéminente; quelquefois des excavations se forment sur son trajet; leurs bords sont taillés à pic, la liquéfaction ne se généralise jamais.

c ne liquéfie pas la gélatine.

Formes ramifiées. — L'action de la température de 35° est sans action sur les microbes *b* et *c*; ils s'y habituent très facilement, et se développent aussi abondamment et plus vite qu'à la température de la chambre.

Lorsqu'on fait usage, à 35°, de gélose additionnée de 1/1000 d'acide tartrique ou d'acide oxalique, le bacille *b* forme des filaments composés généralement de deux segments dont les extrémités paraissent vides et ne prennent pas la couleur. Pour observer les formes ramifiées, il faut examiner des cultures de 24 heures; elles sont alors constituées par des colonies sèches, aplaties, très minces, comme de légères écailles; elles renferment des bâtonnets enchevêtrés présentant souvent des renflements et des ramifications très nettes.

Au bout de 48 heures, les filaments commencent à se segmenter en boules, et à partir de ce moment la mucosité se forme; dans les cultures de 3 à 4 jours on ne trouve plus de formes longues et ramifiées.

Le bacille *c* s'est montré complètement réfractaire à cette

Elle liquéfie énergiquement la gélatine, et se comporte ensuite dans le liquide comme dans les bouillons.

Elle ne coagule pas le lait; elle se développe très bien sur pomme de terre glycérinée, mais perd son aspect particulier : elle forme un épais enduit glaireux.

transformation; j'ai fait une série de trente réensemencements successifs, d'abord toutes les 24 heures, puis à huit heures d'intervalle; à aucun moment il n'a présenté de formes rameuses; j'ai arrosé des cultures âgées de huit heures avec quelques gouttes d'acide oxalique au 1/300; il n'en a pas trahi la moindre gêne dans son développement.

Les microbes présentaient cependant des modifications assez prononcées vers le quinzième passage: quelques-uns avaient la forme de point d'exclamation; leur contenu, d'une manière générale, était granuleux et vacuolaire. Le 15^e passage a servi à ensemençer un tube de gélose alcaline; la culture a été conservée à la température de la chambre. Le 30^e passage a été exposé à la température de 35° pendant 30 jours, puis ensemençé sur milieu alcalin et conservé à la température de la chambre. Nous la retrouverons plus loin.

Fixation de l'azote libre. — Pour étudier le pouvoir fixateur des bacilles *b* et *c* vis-à-vis de l'azote libre, j'ai employé la méthode habituelle. Le tableau suivant contient le résumé des résultats obtenus :

Désignation des cultures.	Sucre initial. mgr.	Sucre consommé. mgr.	Az. init. mgr.	Az. final. mgr.	Az. gagné. mgr.
N ^o 1 (b)	1500	»	19,5	22,8	3,3
2 (c)	id.	»	19,5	23,5	6,0
3 (b)	1750	585	7,1	7,4	0,4
4 (c)	id.	1376	7,1	10	2,9
5 (b+c)	id.	1307	7,1	13,4	6,3

Les cultures n^{os} 1 et 2 ont été beaucoup plus actives que les n^{os} 3 et 4. L'explication se trouve peut-être dans la composition des bouillons; ce qui montre d'ailleurs que le second n'est pas favorable, c'est l'apparition des spores dans le n^o 3. Par contre les deux formes associées doublent la quantité d'azote initial; ceci prouve que les deux microbes s'influencent favorablement, à l'instar des formes différenciées des microbes des nodosités. L'aspect des cultures concorde bien avec ces résultats, d'après ce que l'on sait des relations de la mucosité avec l'azote gagné. Dans le vase n^o 5, le bouillon est littéralement gélatinisé.

Inoculation des plantes. — Jusqu'ici, il n'y a pas concordance complète entre les caractères du bacille *c* et ceux du microbe

des nodosités; *b* seul répond à toutes les exigences; *c* possède à un haut degré la faculté de fixer l'azote libre, mais il ne produit pas de formes rameuses. L'inoculation des plantes va trancher la question.

J'ai inoculé les formes microbiennes suivantes en employant encore des vesces de Narbonne végétant en milieu stérile.

1^o Bactérie *a*; 2^o bacille *b*; 3^o bacille *c*; 4^o *a* + *b*; 5^o *a* + *c*; 6^o *c* + *b*. Les plants inoculés avec (*c* + *b*) seuls ont donné des résultats positifs, qui ont été confirmés immédiatement après par une nouvelle série d'expériences.

Si on rapproche ces résultats de ceux qu'on a obtenus avec les formes différenciées du bacille authentique, on saisit facilement l'harmonie qui existe entre eux; et comme on a déjà établi que les variétés de microbes, étudiées dans le chapitre précédent, appartiennent à une espèce unique, on est en droit de conclure que les deux microbes *b* et *c* constituent aussi deux formes différentes des microbes des nodosités.

On connaît donc maintenant la forme de résistance de ce microbe; c'est la bactérie *a*; mais, à côté de cette forme de résistance, il y en a d'autres qui vivent à l'état de liberté dans le sol, comme des microbes saprophytes; le bacille *c* est de ce nombre. Comme c'est lui qui se rapprochait le plus de la forme typique, parmi toutes les espèces qui peuplaient la culture B, c'est à lui que j'ai donné la préférence dans mes démonstrations. Il se peut que toutes les autres espèces qui poussaient à côté de *c* soient distinctes du microbe des nodosités. Néanmoins il existait dans cette culture un ensemble d'espèces qui s'influençaient d'une manière favorable. Aucune des espèces associées ne donnait en culture pure un développement comparable à celui qu'atteignait la culture B, et le bacille *c* lui-même n'a fourni ce résultat qu'à la suite d'un grand nombre de passages sur gélose.

La bactérie *a* est un microbe immobile; elle est incapable d'obéir aux actions chimiotaxiques exercées par la racine des légumineuses; elle ne s'implante pas sur ces organes; ce sont les formes libres et mobiles seules qui produisent l'infection des plantes.

IX

LES MICROBES DES NODOSITÉS POSSÈDENT UNE FORME OOSPORA

J'ai montré comment la bactérie *a* passe au stade bacillaire *b*. J'ai insisté sur ce fait, que le bacille *b* ne se fixe que lentement; lorsque celui-ci affecte la forme ramifiée ou lorsque le microbe des nodosités subit les mêmes transformations, on assiste encore à un commencement d'évolution vers une forme ignorée. On ne peut pas dire que ces éléments ramifiés représentent un stade de souffrance, puisqu'ils sont la règle dans les tubercules radicaux. Quelle peut être cette forme jusqu'ici purement hypothétique? Si on regarde les figures 2 et 3, Pl. I, et les figures 1 et 2, Pl. II, on voit que les organismes qu'elles représentent offrent la plus grande analogie avec les fragments dissociés d'un mycélium âgé d'oospora; je n'ai pas réussi à conserver et à fixer ces formes dans mes cultures; mais elles se sont développées elles-mêmes spontanément dans la culture faite avec le 15^e passage du bacille *c*, conservée à la température de la chambre (voir p. 54). Au bout de deux mois, cette culture, placée horizontalement, portait à la surface de la mucosité¹ quatre petits amas d'une poussière d'un gris cendré, accompagnés d'un grand nombre d'autres particules presque invisibles de la même substance, réparties surtout autour des taches principales.

Je n'ai pas eu de peine à reconnaître la forme oospora avec son mode de sporulation en chapelets. Dans la masse de la mucosité, on trouvait un grand nombre de microbes en voie de transformation; les uns allongés seulement, les autres présentant déjà plusieurs rameaux et formant quelquefois des paquets enchevêtrés (fig. 10, Pl. I).

En présence de ce résultat, qui m'a surpris, étant donné l'échec auquel je m'étais heurté, précisément avec le bacille *c*, dans la recherche des formes ramifiées, je me suis empressé de

1. Cette substance se dessèche très lentement; lorsqu'on incline les tubes, elle s'étale uniformément sur la gélose et la protège contre la dessiccation, pendant cinq ou six mois, même dans les tubes fermés simplement au coton.

des nodosités; *b* seul répond à toutes les exigences; *c* possède à un haut degré la faculté de fixer l'azote libre, mais il ne produit pas de formes rameuses. L'inoculation des plantes va trancher la question.

J'ai inoculé les formes microbiennes suivantes en employant encore des vesces de Narbonne végétant en milieu stérile.

1° Bactérie *a*; 2° bacille *b*; 3° bacille *c*; 4° *a* + *b*; 5° *a* + *c*; 6° *c* + *b*. Les plants inoculés avec (*c* + *b*) seuls ont donné des résultats positifs, qui ont été confirmés immédiatement après par une nouvelle série d'expériences.

Si on rapproche ces résultats de ceux qu'on a obtenus avec les formes différenciées du bacille authentique, on saisit facilement l'harmonie qui existe entre eux; et comme on a déjà établi que les variétés de microbes, étudiées dans le chapitre précédent, appartiennent à une espèce unique, on est en droit de conclure que les deux microbes *b* et *c* constituent aussi deux formes différentes des microbes des nodosités.

On connaît donc maintenant la forme de résistance de ce microbe; c'est la bactérie *a*; mais, à côté de cette forme de résistance, il y en a d'autres qui vivent à l'état de liberté dans le sol, comme des microbes saprophytes; le bacille *c* est de ce nombre. Comme c'est lui qui se rapprochait le plus de la forme typique, parmi toutes les espèces qui peuplaient la culture B, c'est à lui que j'ai donné la préférence dans mes démonstrations. Il se peut que toutes les autres espèces qui poussaient à côté de *c* soient distinctes du microbe des nodosités. Néanmoins il existait dans cette culture un ensemble d'espèces qui s'influençaient d'une manière favorable. Aucune des espèces associées ne donnait en culture pure un développement comparable à celui qu'atteignait la culture B, et le bacille *c* lui-même n'a fourni ce résultat qu'à la suite d'un grand nombre de passages sur gélose.

La bactérie *a* est un microbe immobile; elle est incapable d'obéir aux actions chimiotaxiques exercées par la racine des légumineuses; elle ne s'implante pas sur ces organes; ce sont les formes libres et mobiles seules qui produisent l'infection des plantes.

IX

LES MICROBES DES NODOSITÉS POSSÈDENT UNE FORME OOSPORA

J'ai montré comment la bactérie *a* passe au stade bacillaire *b*. J'ai insisté sur ce fait, que le bacille *b* ne se fixe que lentement; lorsque celui-ci affecte la forme ramifiée ou lorsque le microbe des nodosités subit les mêmes transformations, on assiste encore à un commencement d'évolution vers une forme ignorée. On ne peut pas dire que ces éléments ramifiés représentent un stade de souffrance, puisqu'ils sont la règle dans les tubercules radicaux. Quelle peut être cette forme jusqu'ici purement hypothétique? Si on regarde les figures 2 et 3, Pl. I, et les figures 1 et 2, Pl. II, on voit que les organismes qu'elles représentent offrent la plus grande analogie avec les fragments dissociés d'un mycélium âgé d'oospora; je n'ai pas réussi à conserver et à fixer ces formes dans mes cultures; mais elles se sont développées elles-mêmes spontanément dans la culture faite avec le 15^e passage du bacille *c*, conservée à la température de la chambre (voir p. 51). Au bout de deux mois, cette culture, placée horizontalement, portait à la surface de la mucosité¹ quatre petits amas d'une poussière d'un gris cendré, accompagnés d'un grand nombre d'autres particules presque invisibles de la même substance, réparties surtout autour des taches principales.

Je n'ai pas eu de peine à reconnaître la forme oospora avec son mode de sporulation en chapelets. Dans la masse de la mucosité, on trouvait un grand nombre de microbes en voie de transformation; les uns allongés seulement, les autres présentant déjà plusieurs rameaux et formant quelquefois des paquets enchevêtrés (fig. 10, Pl. I).

En présence de ce résultat, qui m'a surpris, étant donné l'échec auquel je m'étais heurté, précisément avec le bacille *c*, dans la recherche des formes ramifiées, je me suis empressé de

1. Cette substance se dessèche très lentement; lorsqu'on incline les tubes, elle s'étale uniformément sur la gélose et la protège contre la dessiccation, pendant cinq ou six mois, même dans les tubes fermés simplement au coton.

Le bacille *b* avait évolué vers la forme ramifiée, représentée dans la fig. 7, Pl. II.

Le microbe des nodosités présentait des formes renflées, des formes irrégulières dont quelques-unes ramifiées.

L'oospora, qui avait été ensemencé à l'état de mycélium¹, est représenté par quelques fragments de tubes vides à côté desquels on observe quelques formes rondes groupées par deux.

Les milieux liquides ensemencés avec ces trois formes se troublent au bout de 24 heures. En goutte suspendue, on ne trouve qu'une forme à peu près ronde, isolée, ou groupée par deux, ou réunie en chaînes.

Les milieux solides présentent les mêmes microbes qui poussent assez abondamment. Au bout de trois semaines, la forme oospora apparaît, représentée par 3 colonies; le microbe des nodosités donne immédiatement quelques colonies de bactéries *a*, reconnaissables à leur mode de développement si caractéristique; les filaments produisent des spores au bout de trois jours; il y a donc eu un retour brusque vers le stade sporulé; cette transformation ne s'est jamais produite dans mes cultures ordinaires. Par contre, aucune colonie ne rappelle par son aspect celles du bacille typique.

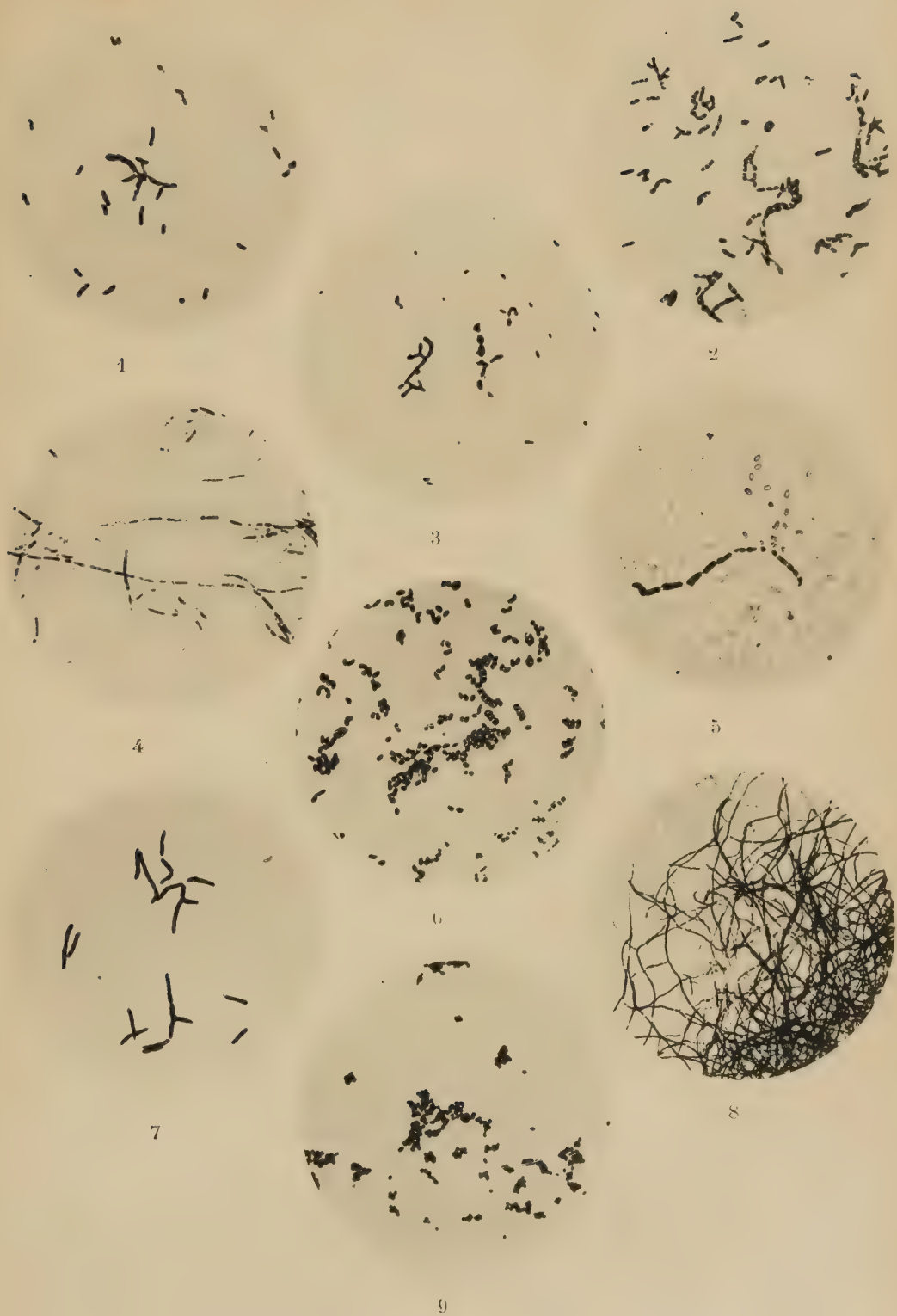
Toutes ces formes de transition disparaissent au bout du troisième passage en sac, et, à partir de ce moment, les trois cultures sont identiques sur les mêmes milieux de culture, bien que les microbes aient passé par deux espèces animales et à des époques différentes.

La forme commune aux trois microbes est une forme ronde d'une finesse extrême; les grains ont un diamètre de 0,45 à 0,47 μ , ils sont isolés ou groupés par deux ou même réunis en petites chaînes.

Tous trois forment un enduit très mince sur les milieux solides, bleuâtre par transparence et gris par réflexion.

Ils troublent uniformément le bouillon, puis se déposent au bout de trois ou quatre jours en formant un amas visqueux qui s'élève en fils par l'agitation.

1. Les spores ne germent pas dans les sacs mêmes après un mois de séjour dans le péritoine. Si on les reprend dans le sac pour les ensemencer sur des tubes de gélose de viande, elles germent et donnent exclusivement des colonies d'oospora qui produisent des spores au bout de huit à dix jours; on a vu qu'avant ce passage elles ne sporulaient pas sur ce milieu.



Ils liquéfient la gélatine sans la troubler.

Ils coagulent énergiquement le lait ; le coagulum se rétracte et se sépare du sérum.

Ils acidifient tous les bouillons sans dégagement de gaz, même dans les bouillons lactosés. Si on les additionne d'un peu de carbonate de chaux, les bulles se forment au bout de trois ou quatre heures.

La réaction acide des bouillons permet de pousser plus loin l'identification en déterminant la nature et la quantité des acides qui prennent naissance dans des milieux de composition variable.

Voici les résultats obtenus avec trois bouillons différents :

NATURE DES MICROBES	BOUILLON DE VIANDE à 1,5/100 de peptone.			BOUILLON DE MARICOT à 3/100 de lactose.				BOUILLON DE MARICOT à 3/100 de sucre.			
	Acidité totale p. 0 0.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acidité totale.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acide formique.	Acidité totale.	Acide lactique.	Acide acétique.	Acide formique
Bacille des nod.	»	»	»	1,15	0,73	traces.	0,42	0,27	0,10	0,13	0,05
Bacille b.	2,5	2,05	0,43	1,20	0,64	id.	0,56	0,30	0,04	0,2	0,06
Oospora.	2,05	0,97	1,12	1,22	0,59	id.	0,63	0,34	traces.	0,27	traces.

Comme on le voit, les trois microbes, placés dans les mêmes conditions, produisent les mêmes acides à peu près dans les mêmes proportions.

Propriétés pathogènes des trois formes microbiennes. — Ici encore les résultats concordent. Les petits lapins de 1,000 grammes, inoculés sous la peau ou dans le péritoine, meurent au bout d'un temps variant de 10 jours à 3 semaines. L'inoculation sous-cutanée est toujours suivie d'un abcès qui évolue lentement.

Le sang ne renferme jamais de microbes ; on en trouve toujours dans l'exsudat péritonéal qui est assez abondant. Les cultures fournies par cet exsudat possèdent les mêmes caractères que les cultures qui ont servi aux inoculations.

Un lapin de 1,000 grammes, inoculé sous la peau avec 1 c. c. d'une culture en bouillon faite avec le contenu du premier sac

ensemencé avec le microbe des nodosités, est mort au bout de 3 semaines. L'exsudat péritonéal, aspiré à l'aide d'une pipette à travers la paroi abdominale, ensemencé sur un tube de gélose, a donné une culture qui renfermait quelques colonies d'oospora à côté de colonies nombreuses dues à la forme ronde. Le contenu du même sac a déjà donné la bactérie *a*; on a donc retrouvé, en partant du bacille authentique des légumineuses, les deux formes que l'on a déjà obtenues avec les microbes retirés du sol. Mais les stades sporogènes sont très instables dans les conditions où nous avons opéré. Il faut les saisir au bon moment.

Ainsi, en résumé, les microbes des nodosités présentent une succession de générations alternantes qui rappellent assez exactement le mode de développement d'un grand nombre de végétaux et d'animaux inférieurs.

La bactérie *a* est répandue dans le sol, surtout à la surface; on la rencontre de préférence en hiver et au printemps; pour la forme oospora c'est l'inverse; celle-ci est très rare en hiver et très commune à la fin de l'été. C'est ainsi par exemple qu'au mois de septembre, sur un total de 169 colonies des différentes espèces microbiennes qui ont poussé sur six tubes de gélose de haricots ensemencés avec une trace de délayure de terre, j'ai compté une colonie de bactéries *a*, et 43 colonies appartenant à deux ou trois espèces d'oospora. Ce résultat, vérifié immédiatement après, avec des tubes de gélose de viande, s'est confirmé rigoureusement. Sans accorder à ces chiffres plus d'importance qu'ils n'en comportent, il est permis de dire toutefois que la succession des saisons exerce une certaine influence sur les formes sporogènes du microbe des nodosités. Les spores endogènes, plus résistantes aux intempéries, sont surtout communes en hiver, tandis que les conidies, qui constituent d'excellents agents de dissémination, se rencontrent principalement en été. C'est là, on le sait, une loi très générale chez les champignons microscopiques.

La réaction de Gram appliquée aux microbes des nodosités. — La méthode de coloration de Gram est employée couramment pour caractériser les espèces microbiennes; elle ne s'applique pas aux différentes formes des microbes des nodosités. Ainsi, les microbes contenus dans les tubercules, colorés par le violet d'Ehrlich, et traités ensuite par la solution de Gram, ne se déco-

lorent pas complètement par l'alcool. Au bout de deux passages sur gélose, ils se décolorent complètement.

Le bacille *b* prend le Gram plus ou moins bien; le bacille *c* ne le prend pas; toutes les formes rondes le prennent, ainsi que quelques formes bacillaires cultivées sur pomme de terre, au moment où elles évoluent vers la forme ronde; les autres bacilles différenciés ne le prennent pas. Les deux formes sporogènes le prennent.

Les formes ramifiées obtenues avec le bacille *c* le prennent également; cependant la décoloration est partielle; sur un même filament, les parties renflées restent colorées pendant que tout le reste se décolore.

Des deux formes bacillaires issues de la forme ronde, culture n° 3, tableau p., l'une se décolore complètement, l'autre partiellement.

X

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Pour résumer les conclusions de ce travail, il nous suffira d'exposer brièvement l'histoire du bacille des légumineuses, telle que nous venons de l'établir.

Les formes libres du sol, attirées sur les racines des légumineuses par l'intermédiaire des hydrates de carbone diffusés dans la région des poils absorbants, pénètrent dans les tissus à l'état de coccobacilles, et provoquent la formation d'un méristème qui donne naissance aux tubercules.

Tant que les vaisseaux ne sont pas formés, ces coccobacilles restent englobés dans une matière glaireuse qui simule l'aspect d'un mycélium. Plus tard, lorsque la sève circule dans les tubercules, la mucosité est emportée dans toutes les régions de la plante; les bacilles sont alors exposés à l'action permanente des acides dissous dans le suc végétal; ils réagissent contre cette influence en formant des ramifications. Le pseudo-mycélium ne constitue pas un organisme vivant, une forme de transition du microbe des nodosités; les observations que nous avons faites dans le cours de ce travail (p. 16 et 43) confirment la conclusion que nous avons exposée (p. 24), on ne peut pas

retrouver ces tubes muqueux, ni dans la pulpe des nodosités broyées sur une lame, ni dans les coupes colorées par les couleurs d'aniline ; il n'en serait pas de même si la forme d'infection était la bactérie α ou la forme oospora, ces deux microorganismes résistant à tous les réactifs colorants aussi bien d'ailleurs qu'aux manipulations nécessitées par la préparation des inclusions pour les coupes en série.

Lorsque la plante arrive au terme de son évolution, les nodosités privées de sève et d'aliments se vident en partie ; elles ne renferment plus que des formes simples qui ne sont pas des formes banales du sol, mais des microbes issus du bacille typique, possédant des propriétés nouvelles et capables de vivre en liberté dans le sol.

La fixation de l'azote libre se fait dans les cultures artificielles aussi bien que dans les nodosités ; elle est là comme ici le résultat d'une synthèse qui se fait aux dépens de l'énergie mise en jeu par la combustion des hydrates de carbone.

Toutes les formes si variées qui se rencontrent dans la nature peuvent s'obtenir dans les milieux artificiels en faisant agir convenablement l'action des acides et de la chaleur ; les milieux peptonisés produisent les mêmes résultats ; on les obtient encore en exagérant la richesse en sucre ou en composés minéraux alimentaires.

Les bacilles récemment isolés des nodosités conservent la propriété de produire de nouveaux tubercules par inoculation ; les formes différenciées dans le sens de la vie saprophyte la perdent peu à peu ; mais le travail qu'une seule de ces formes est incapable de produire, deux formes associées peuvent l'accomplir ; cette influence de l'association est tout à fait nette, aussi bien dans la production des nodosités sur les racines que dans la fixation de l'azote libre dans les cultures.

C'est évidemment grâce à cette propriété que les formes saprophytes du sol parviennent à se fixer sur les racines et à former des tubercules ; nous n'avons pas réussi à isoler de la terre un microbe capable par lui-même de produire des nodosités. On ne peut pas en inférer qu'il n'en existe pas à aucune époque de l'année ; ceux que nous avons obtenus ont été isolés au commencement du printemps.

Les formes indépendantes des microbes des nodosités

représentent un stade dissocié d'un végétal qui possède en outre deux formes sporogènes ; l'une, la bactérie *a*, donne des spores endogènes, l'autre est un oospora et donne des conidies. Ces deux derniers stades se rencontrent de préférence à la surface du sol ; la bactérie *a* est très répandue en hiver, la forme oospora se rencontre surtout à la fin de l'été. Ce mode de développement pourrait bien être plus répandu dans le monde des microbes qu'on ne se l'imagine ; l'évolution de ces êtres serait ainsi semblable à celle d'un grand nombre de végétaux et d'animaux inférieurs.

Le microbe des légumineuses est pathogène pour quelques espèces animales ; il affecte dans l'organisme une forme à peu près ronde d'un diamètre très réduit ; elle a une tendance à se mettre en chaîne.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1. — Microbes extraits de la pulpe des nodosités et transformés par un séjour de 24 heures sur gélose au bouillon de haricots à 3 0/0 de sucre. Une forme ramifiée donne naissance à plusieurs coccobacilles séparés par des vésicules qui se résorbent rapidement. Les vésicules se produisent sous l'influence des courants osmotiques provoqués par le changement d'habitat des microbes. $G = 1,200 D$.

Fig. 2. — Formes en poires obtenues sur gélose de viande peptonisée, les portions incolores représentent des vacuoles. $G = 1,200 D$.

Fig. 3. — Formes ramifiées et renflées obtenues à 33° sur gélose acide; elles ressemblent aux formes dissociées des filaments âgés d'oospora. $G = 1,200 D$.

Fig. 4. — Tubes muqueux formés dans une culture de bouillon de haricots à 6 0/0 de saccharose, traversant une portion de membrane. $G = 1200 D$.

Fig. 5. — Les mêmes à un grossissement plus faible, 500 D environ.

Fig. 6. — Tubes muqueux formés dans le feutrage des poils absorbants, obtenus avec un bacille qui ne donne plus de mucosité. — L'intérieur de ce tube est rempli de coccobacilles comme le tube de la fig. 4.

Les filaments foncés sont des fragments de poils absorbants. $G = 100 D$.

Fig. 7. — Aspect d'une culture sur plaque de gélose de la bactérie, vue à l'œil nu.

Fig. 8. — La même à un grossissement de 100 D. Toutes les bactéries sont transformées en spores.

Fig. 9. — Forme courte de bactérie *c* se transformant en coccobacilles. Ceux-ci restent disposés en files dans l'intérieur du filament qui se colore de plus en plus mal. Les coccobacilles se reproduisent et forment des zoogléas enfermées dans une capsule commune.

Fig. 10. — Culture du bacille *a* évoluant vers la forme oospora; les filaments n'ont pas encore donné de conidies.

PLANCHE II

Fig. 1. — Forme ramifiée du bacille des nodosités obtenues sur gélose alcaline à 33°. $G = 1,200 D$.

Fig. 2. — Portion obtenue avec la même préparation, montrant les

formes ramifiées groupées par l'évaporation du liquide sur la lame de verre. $G = 1,200\ D$.

Fig. 3 — Formes ramifiées de la même culture se résolvant en bacilles après un séjour de quelques heures en milieu liquide à 25° . $G = 1,200\ D$.

Fig. 4 — Bactérie *a*. Culture âgée, sur pomme de terre glycinée. $G = 1,000\ D$.

Fig. 5. — Spores de la bactérie *a* obtenues sur gélose au bouillon de haricot. $G = 1,000\ D$.

Fig. 6. — Bactérie *a* se transformant en coccobacilles. Culture diluée dans de l'eau distillée. $G = 1,200\ D$.

Fig. 7. — Forme ramifiée obtenue à 35° sur gélose acide avec le coccobacille issu de la bactérie. $G = 1,200\ D$.

Fig. 8. — Fragment de colonie jeune d'oospora. $G = 1,000\ D$.

Fig. 9. — Forme commune à la bactérie *a*, au microbe des nodosités, et à la forme oospora, obtenue par des passages en sac de collodion dans le péritoine des animaux. $G = 1,200\ O$.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

(ÉTUDE SPECTROSCOPIQUE D'UN MÉTAL)

Vu et approuvé :

Paris, le 27 novembre 1897.

Le Doyen de la Faculté des sciences.

G. DARBOUX.

Vu et permis d'imprimer,

Le vice-recteur de l'Académie de Paris,

GRÉARD.

